

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

WAGNER HUMMIG

AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA NALTREXONA EM DOSE  
ULTRABAIXA EM MODELO DE DOR OROFACIAL PÓS-OPERATÓRIA

CURITIBA

2022

WAGNER HUMMIG

AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA NALTREXONA EM DOSE  
ULTRABAIXA EM MODELO DE DOR OROFACIAL PÓS-OPERATÓRIA

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

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Juliana Geremias Chichorro

CURITIBA

2022

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Hummig, Wagner.

Avaliação do efeito antinociceptivo na naltrexona em dose ultrabaixa em modelo de dor orofacial pós-operatória. / Wagner Hummig. – Curitiba, 2022.

1 recurso on-line : PDF.

Orientadora: Juliana Geremias Chichorro.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

1. Dor orofacial. 2. Hiperalgisia. 3. Opióides. I. Título. II. Chichorro, Juliana Geremias. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.



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

ATA Nº323

## ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DOUTORADO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM FARMACOLOGIA

No dia vinte e cinco de novembro de dois mil e vinte e dois às 09:00 horas, na sala Auditório, PPG Farmacologia, foram instaladas as atividades pertinentes ao rito de defesa de tese do doutorando **WAGNER HUMMIG**, intitulada: **AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA NALTREXONA EM DOSE ULTRA BAIXA EM MODELO DE DOR OROFACIAL PÓS-OPERATÓRIA**, sob orientação da Profa. Dra. JULIANA GEREMIAS CHICHORRO. A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: JULIANA GEREMIAS CHICHORRO (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), JOSE STECHMAN NETO (UNIVERSIDADE TUIUTI DO PARANÁ), ELCIO JULIATO PIOVESAN (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), JOICE MARIA DA CUNHA (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ). A presidência iniciou os ritos definidos pelo Colegiado do Programa e, após exarados os pareceres dos membros do comitê examinador e da respectiva contra argumentação, ocorreu a leitura do parecer final da banca examinadora, que decidiu pela APROVAÇÃO. Este resultado deverá ser homologado pelo Colegiado do programa, mediante o atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca dentro dos prazos regimentais definidos pelo programa. A outorga de título de doutor está condicionada ao atendimento de todos os requisitos e prazos determinados no regimento do Programa de Pós-Graduação. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, JULIANA GEREMIAS CHICHORRO, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos demais membros da Comissão Examinadora.

CURITIBA, 25 de Novembro de 2022.

Assinatura Eletrônica

29/11/2022 10:54:58.0

JULIANA GEREMIAS CHICHORRO  
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

30/11/2022 11:07:58.0

JOSE STECHMAN NETO  
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE TUIUTI DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

28/11/2022 20:08:11.0

ELCIO JULIATO PIOVESAN  
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

28/11/2022 15:47:00.0

JOICE MARIA DA CUNHA  
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

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: 238820

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp>  
e insira o código 238820



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 FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **WAGNER HUMMIG** intitulada: **AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA NALTREXONA EM DOSE ULTRA BAIXA EM MODELO DE DOR OROFACIAL PÓS-OPERATÓRIA**, 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 doutor 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, 25 de Novembro de 2022.

Assinatura Eletrônica

29/11/2022 10:54:58.0

JULIANA GEREMIAS CHICHORRO  
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

30/11/2022 11:07:58.0

JOSE STECHMAN NETO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE TUIUTI DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

28/11/2022 20:08:11.0

ELCIO JULIATO PIOVESAN

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

28/11/2022 15:47:00.0

JOICE MARIA DA CUNHA

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

---

Centro Politécnico - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531990 - Tel: (0xx41)3361-1693 - E-mail: [pgfarmacologia@ufpr.br](mailto: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: 238820

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp>  
e insira o código 238820

Dedico este trabalho à minha amada esposa Simone e ao nosso filho Gustavo, por serem meu grande alicerce e apoio incondicional continuamente!

## AGRADECIMENTOS

À minha querida orientadora, a Professora Juliana Geremias Chichorro. Quero agradecer imensamente por você ter direcionado todos meus passos, sempre com zelo e atenção. Obrigado por seus ensinamentos que nortearam toda esta tese, seu ombro amigo nos dias nebulosos que a vida sorrateiramente nos oferta. Mas com um sorriso estampado no rosto, você sempre dizia: Tudo vai dar certo! Obrigado por ter acreditado no meu potencial e confiado tão grande responsabilidade em tornar-me um Doutor. Gratidão hoje e sempre!

Ao professor José Stechman Neto, que foi o grande precursor em mostrar-me o mundo da Dor, sempre motivando meu crescimento profissional e investindo dia a dia em minhas qualidades, apontando meus erros quando necessário, e como amigo, sempre reforçando meus talentos, a fim de tornar-me um profissional completo.

Ao Dr. Daniel Benzecry de Almeida, que gentilmente me acolheu no Grupo da Dor no Instituto de Neurologia de Curitiba (INC-PR), grande amigo que não mede esforços para ensinar a arte de tratar a Dor, mas não somente isto, a arte de sermos instrumentos nas mãos de Deus para abençoar a vida de nossos pacientes, trazendo o alento que eles tanto precisam. Obrigado por sua leal amizade, seus conselhos, apoio irrestrito ao longo de toda minha jornada acadêmica, desde mestrado até o doutorado, e por ensinar que sempre estamos na dependência de Deus.

Ao Dr. Albert Friesen, amigo absoluto quando necessito de apoio e instrução psicológica. Ombro amigo que sempre tem um sábio conselho para dar, alguém que diz palavras de encorajamento quando o mundo parece estar blindado... Vai, você pode! Você é um guerreiro! Você é vencedor! Deus é contigo! Obrigado por sua amizade, orações e ombro amigo!

Aos meus pais, Bruno Hummig (*in memoriam*) e Carmen Lúcia Rasesa Hummig. Gratidão eterna por tudo que fizeram por mim, sempre por me ensinarem

que depois da tempestade vem a bonança. Obrigado por suas orações e por se alegrarem com minhas conquistas, pois dedico também a vocês esta vitória.

Aos meus irmãos Wesley Hummig e Weber Hummig, dupla de feras! Pessoas de coração incrível, que não mediram esforços para me abençoar em toda jornada deste doutorado. Obrigado por suas orações e apoio.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório da Dor Orofacial, especialmente à querida Darciane Favero Baggio e Raphael Vieira Lopes, que me auxiliaram em diversos experimentos, e também à querida Vanessa Bordenowsky Pereira Lejeune por seu apoio artístico nos esquemas e figuras. Realmente o trabalho em equipe foi fundamental no desenvolvimento e conclusão desta tese. Muito obrigado!!!

Aos demais colegas do Departamento de Farmacologia da UFPR, pelos momentos agradáveis de risos e compartilhamento de estudos.

Ao professor Luiz Eduardo Nunes Ferreira e Silmara Martins Dias dos Santos, nossos grandes colaboradores da Universidade de Guarulhos. Muito obrigado por terem realizado todas análises *in vitro* desta pesquisa.

Aos professores e funcionários do Departamento de Farmacologia da UFPR pelos ensinamentos irrestritos, ajuda, assistência e apoio permanente.

Aos membros da banca titulares: Dra. Joice Maria da Cunha, Dr. José Stechman Neto, Dr. Élcio Juliato Piovesan, e membros suplentes: Dra. Renata Reis e Dra. Natalia Fantin Sardi. Agradeço imensamente por terem aceito o convite e disponibilizado seu tempo para contribuir com a tese.

Aos animais que foram usados nos experimentos, que cederam suas vidas em prol da ciência. A vida de vocês não foi em vão!

À CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.



Bendize, ó minha alma, ao Senhor, e tudo o que há em mim bendiga o seu Santo nome. Bendize, ó minha alma, ao Senhor, e não te esqueças de nenhum dos seus benefícios. (SALMOS 103:1,2)

## RESUMO

O controle da dor aguda pós-operatória (DAPO) é habitualmente obtido por analgésicos opioides, os quais estão associados a inúmeros efeitos adversos, inclusive risco de adição e dependência. Portanto, há décadas tem-se buscado alternativas mais seguras para o controle da dor. Nesse sentido, uma opção que vem sendo explorada, é o Cloridrato de Naltrexona (NTX), um antagonista não-seletivo de receptores opioides, que ao ser utilizado em doses ultrabaixas (ULD), apresenta características farmacodinâmicas distintas e potencial antinociceptivo. Assim, o objetivo geral desse estudo foi avaliar o efeito da NTX em doses ultrabaixas (ULDN) em modelo de DAPO orofacial, bem como investigar possíveis mecanismos de ação relacionados a esse efeito. Ratos Wistar submetidos a incisão de mucosa intraoral (modelo de DAPO) foram tratados com NTX no dia 03 pós-cirúrgico, seguido de avaliação da hiperalgesia térmica (machos e fêmeas) e mecânica (machos) em intervalos de 1 hora até a 4ª hora. Nesse mesmo protocolo, em ratos machos foi avaliado o efeito da associação de NTX com uma dose subterapêutica de morfina. Para determinar o principal sítio de ação da NTX, seu efeito antinociceptivo foi avaliado após administração na mucosa oral, gânglio do trigêmeo (GT) e subnúcleo caudal do trigêmeo (Vc). Em adição, o efeito da NTX no GT e Vc foi avaliado em animais tratados previamente com um antagonista TLR4 (LPS-RS) nessas estruturas. No 3º dia pós-cirúrgico, o GT de animais tratados com NTX foi coletado para dosagem de IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e Substância P (SP), através de ELISA. O efeito da NTX foi avaliado na hiperalgesia térmica e no aumento de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  induzidos por LPS. Por fim, foi avaliado o efeito da NTX na liberação de óxido nítrico (NO) e níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e CXCL-2 em macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS. Os resultados mostram que o tratamento com ULDN sistêmica foi capaz de reduzir a hiperalgesia térmica e mecânica por até 3 e 4 horas respectivamente em ratos machos, e reduziu a hiperalgesia térmica em fêmeas. A associação de morfina e ULDN, em doses que não demonstraram efeito *per se*, promoveram efeito anti-hiperalgésico até a 2ª hora após sua administração. A injeção da ULDN no GT e Vc promoveu significativo efeito antinociceptivo, que foi prevenido pelo bloqueio prévio do TLR4. Em ratos machos operados não foi detectado alteração nos níveis de mediadores inflamatórios (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e SP) em amostras coletadas do GT em relação ao controle. Contudo, ratos tratados com LPS na mucosa apresentaram hiperalgesia térmica e aumento nos níveis de IL-1 $\beta$  no GT, os quais foram reduzidos por NTX. Macrófagos estimulados com LPS apresentaram um aumento da liberação de NO e dos níveis de IL-1 $\beta$ , CXCL-2 e TNF- $\alpha$ , os quais foram reduzidos (exceto TNF- $\alpha$ ) pela exposição à NTX. Em conjunto, nossos resultados demonstram o potencial antinociceptivo da ULDN em modelo de dor pós-operatória orofacial e sugerem que o bloqueio da via de sinalização gerada pela ativação do TLR4 contribui para o seu efeito.

**Palavras-chave:** dor orofacial; hiperalgesia; receptor do tipo *tol* 4; incisão intraoral; opioide; LPS

## ABSTRACT

The control of Acute Postoperative Orofacial Pain (APOP) is usually achieved by opioid analgesics, which are associated with numerous adverse effects, including risk of addiction and dependence. Therefore, safer alternatives for pain control have been sought for decades. In this sense, an option that has been explored is Naltrexone Hydrochloride (NTX), a non-selective opioid receptor antagonist, which, when used at ultra-low doses (ULD), presents distinct pharmacodynamic characteristics and antinociceptive potential. Thus, the overall objective of this study was to evaluate the effect of NXT at ultra-low doses (ULDN) in a model of APOP, as well as to investigate possible mechanisms of action related to this effect. Wistar rats submitted to intraoral mucosal incision (APOP model) were treated with NTX on postoperative day 03, followed by evaluation of thermal (males and females) and mechanical (males) hyperalgesia at 1-hour intervals until the 4th hour. In this same protocol, in male rats the effect of the association of NTX with a subtherapeutic dose of morphine was evaluated. To determine the main site of action of NTX, its antinociceptive effect was evaluated after administration to the oral mucosa, trigeminal ganglion (TG) and trigeminal subnucleus caudalis (Vc). In addition, the effect of NTX on the TG and Vc was evaluated in animals previously treated with a TRL4 antagonist (LPS-RS) in these structures. On postoperative day 3, the TG of NTX-treated animals was collected for the dosage of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  and Substance P (SP) by ELISA. The effect of NTX was evaluated on thermal hyperalgesia and LPS-induced increase in TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ . Finally, the effect of NTX on nitric oxide (NO) release and levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and CXCL-2 in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages was evaluated. The results show that systemic ULDN treatment was able to reduce thermal and mechanical hyperalgesia for up to 3 and 4 hours respectively in male rats, and reduced thermal hyperalgesia in females. The association of morphine and ULDN, in doses that showed no effect per se, promoted antinociceptive effect until the 2nd hour after administration. Injection of ULDN in TG and Vc promoted significant antinociceptive effect, which was prevented by prior TLR4 blockade. In operated male rats, no change in the levels of inflammatory mediators (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  and SP) was detected in samples collected from TG compared to control. However, rats treated with LPS in the mucosa showed thermal hyperalgesia and increased IL-1 $\beta$  levels in TG, which were reduced by NTX. LPS-stimulated macrophages showed increased NO release and IL-1 $\beta$ , CXCL-2, and TNF- $\alpha$  levels, which were reduced (except TNF- $\alpha$ ) by NTX exposure. Altogether, our results demonstrate the antinociceptive potential of ULDN in a model of postoperative orofacial pain and suggest that blocking the signaling pathway generated by TLR4 activation contributes to its effect.

**Keywords:** orofacial pain; hyperalgesia; toll-like receptor 4; intraoral incision; opioid; LPS

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** - Avaliação da hiperalgesia térmica em ratos fêmeas e machos após incisão intraoral.....60
- FIGURA 2** - Efeito do tratamento sistêmico com NTX na hiperalgesia térmica e mecânica induzida por incisão intraoral em ratos fêmeas e machos.....62
- FIGURA 3** - Efeito da associação entre morfina e NTX na hiperalgesia térmica induzida por incisão intraoral.....63
- FIGURA 4** - Efeito do tratamento com NTX na mucosa, GT e Vc na hiperalgesia térmica induzida por incisão intraoral.....65
- FIGURA 5** - Influência do bloqueio dos receptores TLR4 no efeito da NTX, na hiperalgesia térmica induzida por incisão intraoral.....67
- FIGURA 6** - Avaliação da influência da NTX nos níveis de mediadores pró-inflamatórios no GT após incisão intraoral.....68
- FIGURA 7** - Efeito do tratamento sistêmico com NTX na hiperalgesia térmica induzida por LPS e níveis de citocinas pró-inflamatórias no GT .....70
- FIGURA 8** - Influência da NTX na viabilidade celular, liberação de NO e de mediadores pró-inflamatórios em macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS..... 72

## LISTA DE ESQUEMAS E TABELA

<b>ESQUEMA 01</b> - Vias somatossensoriais da região orofacial.....	21
<b>ESQUEMA 02</b> - Vias de ação inibitórias e excitatórias dos receptores opioides.....	30
<b>ESQUEMA 03</b> - Vias de sinalização do TLR4.....	38
<b>ESQUEMA 04</b> - Linha do tempo referente ao experimento de hiperalgesia térmica ao calor em animais fêmeas e machos no modelo de dor pós-operatória orofacial.....	50
<b>ESQUEMA 05</b> - Linha do tempo referente ao experimento de avaliação do efeito antinociceptivo da NTX sistêmica na hiperalgesia térmica induzida por incisão em ratos fêmeas e machos.....	51
<b>ESQUEMA 06</b> - Linha do tempo referente ao experimento de avaliação do efeito antinociceptivo da NTX sistêmica na hiperalgesia mecânica induzida por incisão da mucosa em ratos machos.....	51
<b>ESQUEMA 07</b> - Linha do tempo referente ao experimento de avaliação do efeito antinociceptivo da NTX associado à morfina no modelo de dor pós-operatória orofacial.....	52
<b>ESQUEMA 08</b> - Linha do tempo referente ao experimento de avaliação do efeito antinociceptivo da NTX aplicados localmente em mucosa intraoral e centralmente no GT e Vc no modelo de dor pós-operatória orofacial.....	53
<b>ESQUEMA 09</b> - Linha do tempo referente a avaliação do efeito antinociceptivo da NTX após bloqueio dos receptores TLR4 pelo LPS/RS aplicados diretamente no GT ou Vc no modelo de dor pós-operatória orofacial.....	54
<b>ESQUEMA 10</b> - Linha do tempo referente ao experimento de quantificação de citocinas pró-inflamatórias presentes no GT e Vc no efeito da NTX aplicado diretamente nestas estruturas nervosas no modelo de dor pós-operatória orofacial.....	55
<b>ESQUEMA 11</b> - Linha do tempo referente ao experimento de avaliação do efeito antinociceptivo da NTX na hiperalgesia orofacial induzida pelo agonista de TLR4 (LPS).....	56
<b>ESQUEMA 12</b> - Linha do tempo referente ao experimento de quantificação de citocinas pró-inflamatórias presentes no GT, após ativação de receptores TLR4 pelo LPS em mucosa oral no efeito da NTX aplicado diretamente nesta estrutura nervosa.....	56

<b>ESQUEMA 13</b> - Linha do tempo referente ao experimento <i>in vitro</i> de análise da viabilidade celular e liberação de NO em macrófagos estimulados por LPS.....	57
<b>ESQUEMA 14</b> - Linha do tempo referente à análise <i>in vitro</i> de quantificação dos níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ e CXCL-2/MIP-2 em células estimuladas por LPS.....	58
<b>TABELA 1</b> - Principais ramos nervosos que surgem da divisão do nervo trigêmeo.....	20
<b>TABELA 2</b> - Diferentes intervalos de dose da NTX, possíveis mecanismos de ação relacionados e principais usos clínicos.....	32

## LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

AC - Adenilato Ciclase

ANOVA – Análise de variância

ATP – Adenosina trifosfato

AUC – *Area Under Curve* - Área sob a curva

cAMP – *Cyclic Mononucleotide of Adenosine* - adenosina 3,5-monofosfato cíclico

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CFA – Complexo Adjuvante de Freund

CGRP – *Calcitonin Gene Related Peptide* - Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

COX – Ciclooxygenase

CXCL-2 – Chemokine (C-X-C motif) Ligand 2 - Ligante 2 da Quimiocina com motivo C-X-C

DAMP – *Damage-associated Molecular Patterns* - Padrões moleculares associados a patógenos

DAPO – Dor aguda pós-operatória

DOP – Receptor  $\delta$ -opioide (delta)

DOF – Dor orofacial

DPM – Desvio Padrão da Média

DPO – Dor pós-operatória

EPM – Erro padrão da média

GABA – *Gamma-aminobutyric Acid* - Ácido gama amino-butírico

GDP – Difosfato de Guanosina

GT – Gânglio do trigêmeo

GTP – Trifosfato de Guanosina

ICOP – *International Classification of Orofacial Pain* - Classificação Internacional das Dores Orofaciais

i.p – Intraperitoneal

i.t. – Intratecal

KOP – Receptor  $\kappa$ -opioide (Kappa)

LDN – *Low dose naltrexone* – naltrexona em dose baixa

LILACS – Literatura Latino-americana e do Caribe em Ciências da Saúde

LPS – Lipopolissacarídeo de *Pseudomonas Aeruginosa*

LPS/RS – Lipopolissacarídeo de *Rhodobacter Sphaeroides*

MAPKs – *Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinases* – Proteína Quinase Ativada por Mitógeno

MD2 – Myeloid Differentiation Protein 2 – Proteína de Diferenciação Mielóide 2

MOP – Receptor  $\mu$ -opioide (mi)

MYD88 – Myeloid Differentiation Factor 88 - Proteína de Resposta Primária de Diferenciação Mielóide Fator 88

NF- $\kappa$ B – Nuclear Factor Kappa-B - Fator Nuclear Kappa-B

NGF – *Nerve Growth Factor* – Fator de crescimento do nervo

NSDUH – *National Survey on Drug Use and Health* - Pesquisa Nacional sobre Uso de Drogas e Saúde

NSP – Núcleo Sensorial Principal

NTE – Núcleo do Trato Espinal

NTX – *Naltrexone* - Naltrexona

NO – *Nitric Oxide* - Óxido nítrico

NOP – Receptor Nociceptina/Orfanina

PAMP – *Pathogen-associated Molecular Patterns* - Padrões Moleculares Associados a Patógenos

PTX – *Pertussis Toxin* - Toxina Pertussis

s.c. – Subcutânea

SNC – Sistema Nervoso Central

SP – Substância P

TIR – *Toll- interleukin1 (IL-1) receptor* - Domínio Receptor Toll/IL-1

TLR – *Toll like receptor* – Receptores do tipo Toll

TRIF – *TIR domain containing adaptor protein inducing interferon- $\beta$*  - Proteína Adaptadora contendo o Domínio TIR indutora de interferon- $\beta$

ULDN – *Ultra-Low Dose Naltrexone* – Naltrexona em dose ultrabaixa

V1 – Ramo oftálmico do nervo trigêmeo

V2 – Ramo maxilar do nervo trigêmeo

V3 – Ramo mandibular do nervo trigêmeo

Vc – Subnúcleo caudal do trigêmeo

Vi – Subnúcleo interpolar do trigêmeo

Vo – Subnúcleo oral do trigêmeo



## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>19</b>
1.1	DORES OROFACIAIS .....	19
1.2	DOR PÓS-OPERATÓRIA OROFACIAL .....	22
1.2.1	MODELO ANIMAL DE DOR PÓS-OPERATÓRIA OROFACIAL.....	24
1.3	CONTROLE FARMACOLÓGICO DA DOR PÓS-OPERATÓRIA OROFACIAL ...	25
1.4	SISTEMA OPIOIDE .....	27
1.5	NALTREXONA.....	31
1.5.1	ASPECTOS FARMACOCINÉTICOS DA NTX.....	33
1.5.2	ASPECTOS FARMACODINÂMICOS DA NTX .....	34
1.5.3	RECEPTORES TLR4.....	36
1.5.4	EVIDÊNCIAS CLÍNICAS DO EFEITO ANALGÉSICO DA NTX.....	38
1.5.5	EVIDÊNCIAS PRÉ-CLÍNICAS DO EFEITO ANALGÉSICO DA NTX.....	40
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>42</b>
2.1	OBJETIVO GERAL .....	42
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	42
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>43</b>
3.1	MATERIAL.....	43
3.1.1	Animais.....	43
3.1.2	Drogas .....	43
3.2	MÉTODOS .....	44
3.2.1	Modelo de dor pós-operatória orofacial.....	44
3.2.2	Avaliação da hiperalgesia térmica orofacial .....	44
3.2.3	Avaliação da hiperalgesia mecânica orofacial.....	45
3.2.4	Injeção na mucosa oral.....	45
3.2.5	Injeção medular subaracnóidea .....	46
3.2.6	Injeção no GT .....	46
3.2.7	Ensaio imunoenzimático de ELISA para detecção de citocinas .....	47
3.2.8	Avaliação de viabilidade celular, liberação de NO e dosagem de citocinas em macrófagos estimulados com LPS .....	47
3.2.9	Protocolos experimentais.....	49

3.2.10	Análise estatística .....	58
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>59</b>
4.1	DECURSO TEMPORAL DA HIPERALGESIA TÉRMICA EM RATOS FÊMEAS E MACHOS APÓS INCISÃO DA MUCOSA ORAL .....	59
4.2	AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA NTX SISTÊMICA NO MODELO DE DOR PÓS-OPERATÓRIA OROFACIAL.....	61
4.3	EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DA NTX COM MORFINA EM MODELO DE DOR PÓS-OPERATÓRIA OROFACIAL .....	63
4.4	EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA NTX ADMINISTRADA NA MUCOSA, NO GT E NO VC NO MODELO DE DOR PÓS-OPERATÓRIA OROFACIAL .....	64
4.5	EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA NTX APÓS BLOQUEIO DOS RECEPTORES TLR4 NO GT E VC EM MODELO DE DOR PÓS-OPERATÓRIA OROFACIAL.....	66
4.6	INFLUÊNCIA DA NTX NOS NÍVEIS DE MEDIADORES PRÓ-INFLAMATÓRIAS NO GT NO MODELO DE DOR PÓS-OPERATÓRIA OROFACIAL .....	68
4.7	INFLUÊNCIA DA NTX NA HIPERALGESIA OROFACIAL E NOS NÍVEIS DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS NO GT INDUZIDOS POR LPS .....	69
4.8	AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA NTX NA VIABILIDADE CELULAR, LIBERAÇÃO DE NO E LIBERAÇÃO DE MEDIADORES PRÓ-INFLAMATÓRIOS EM MACRÓFAGOS ESTIMULADOS COM LPS .....	71
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>73</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>84</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>85</b>
	<b>ANEXO 1: APROVAÇÃO DO CEUA .....</b>	<b>100</b>
	<b>ANEXO 2: ARTIGO DA TESE .....</b>	<b>101</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 DORES OROFACIAIS

Variados são os fatores etiológicos capazes de deflagrar a Dor Orofacial (DOF), basicamente sua origem advém de 3 categorias: dor musculoesquelética, dor neurovascular e dor neuropática. Importante salientar que inúmeros pacientes apresentam comorbidades associadas a estas condições (ex. alterações psicossociais e distúrbios do sono) que podem resultar em amplificação da sintomatologia dolorosa (BENDER,2018; CRANDAL,2018).

No esforço de normatizar diagnósticos entre profissionais clínicos e pesquisadores que atuam no tratamento e estudo das DOFs, foi elaborado em 2020 a primeira Classificação Internacional das Dores Orofaciais (sigla em inglês ICOP), documento este que abrange de maneira única as principais dores que afetam a região orofacial e critérios diagnósticos específicos que caracterizam tais doenças (PIGG *et al.*, 2021).

O ICOP é dividido didaticamente em 6 capítulos que versam sobre: 1) Dores dentoalveolares e tecidos anatomicamente correlacionados a estruturas; 2) Dores miofasciais; 3) Dores na articulação temporomandibular; 4) Dores neuropáticas que afetam os nervos cranianos; 5) Dores de cabeça que se assemelham às cefaleias primárias e 6) Dores idiopáticas (ICOP, 2020).

A região craniofacial é ricamente innervada e evidencia-se com ampla representação somatossensorial no sistema nervoso central (SNC), e dentre estas inervações, o nervo trigêmeo destaca-se com grande importância (CHICHORRO *et al.*, 2017).

O nervo trigêmeo (NT), também denominado como quinto (V) nervo craniano, é considerado o principal nervo do primeiro arco braquial, assim como o mais abrangente par craniano, sendo extensamente distribuído em região orofacial e segmento cefálico (BATHLA & HEGDE, 2013).

Este nervo é formado anatomicamente por três divisões, a saber: oftálmico (V1), maxilar (V2) e mandibular (V3), sendo os ramos V1 e V2 puramente sensoriais, enquanto que o ramo V3 apresenta-se com função sensorial e motora (BATHLA & HEGDE, 2013).

Os principais ramos extra-cranianos das divisões trigeminais V1, V2 e V3 estão resumidos na Tabela 1 (BATHLA & HEGDE, 2013; SHANKLAND, 2000; SHANKLAND, 2001<sup>a,b,c</sup>).

TRAJETO V1	TRAJETO V2	TRAJETO V3	
NERVO OFTÁLMICO (SENSORIAL)	NERVO MAXILAR (SENSORIAL)	NERVO MANDIBULAR (MISTO)	
		RAMO SENSORIAL	RAMO MOTOR
- Frontal	- Infraorbital	- Meningeal	- Massetérico
- Lacrimal	- Zigomático temporal	- Lingual	- Temporal profundo
- Nasociliar	- Zigomático facial	- Aurículo temporal	- Pterigoideo medial
- Tentório	- Esfenopalatino	- Alveolar inferior	- Pterigoideo lateral
- Nasal externo	- Nasopalatino	- Bucal	- Milohióideo
- Supraciliar	- Palatino maior e menor	- Mental	- Tensor do tímpano
- SupratrocLEAR	- Alveolar superior posterior	- Milo-hióideo	- Tensor do véu palatino
- InfratrocLEAR	- Meningeal		

TABELA 1. Principais ramos nervosos que surgem da divisão do nervo trigêmeo, conforme nomenclatura da Nomina Anatômica (COMISSÃO DE NOMENCLATURA DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ANATOMIA, 1987).

As aferências correspondentes à primeira divisão (V1) inervam o corpo ciliar, região de córnea e íris, a glândula lacrimal e conjuntiva, mucosa da cavidade nasal, os seios esfenoidais e frontal, região de pele da sobrancelha, pálpebras, fronte e nariz, além de regiões do tentório cerebelar e dura-máter (SHANKLAND, 2001<sup>a</sup>).

Já, os ramos da divisão maxilar (V2) são responsáveis pela inervação sensorial que compreende todas as estruturas dentro e ao redor do osso maxilar, terço médio da face, região de pálpebra inferior, região lateral da asa do nariz e lábio superior, membrana mucosa da nasofaringe, seio maxilar, palato mole, tonsila palatina, região gengival maxilar, assim como dentes da arcada superior (SHANKLAND, 2001<sup>b</sup>).

E por fim, a terceira divisão do nervo trigêmeo (V3) é responsável pela inervação sensorial de todos os dentes e gengiva da mandíbula, região da pele do músculo temporal, terço inferior da face, parte anterior da orelha, lábio inferior, músculos pertencentes ao primeiro arco branquial, 2/3 anteriores da língua, assoalho da boca, além de inervação motora dos músculos masseter, temporal, pterigoideo lateral, pterigoideo medial, tensor do véu palatino, tensor do tímpano, milo-hióideo e músculo digástrico em seu ventre anterior (SHANKLAND, 2001<sup>c</sup>).

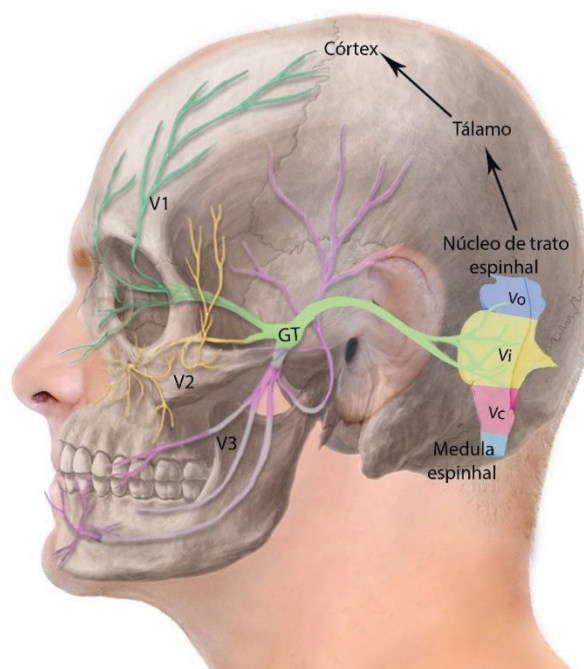
Desta maneira, informações sensoriais nociceptivas provenientes de porções anteriores da cabeça, que abrangem trajetos V1, V2 e V3 (acima detalhadas), nervos occipitais e ramos de raízes cervicais altas, são capazes de ativar o

complexo sensorial do nervo trigêmeo, e por mecanismos de convergência, geram sintomatologia dolorosa em região de território cervical para ramos do nervo trigêmeo e vice-versa (PIOVESAN *et al.*, 2003).

Vale ressaltar que as fibras que compõem os ramos do trigêmeo podem classificar-se como: 1) fibras A-beta (muito mielinizadas, amplo diâmetro e baixo limiar de ativação); 2) fibras A-delta (pouco mielinizadas e com diâmetro considerado médio) e 3) fibras do tipo C (amielinizadas, pequeno diâmetro e baixa velocidade de condução) (CHICHORRO *et al.*, 2017).

Dentre as estruturas anatômicas que se destacam no processamento de estímulos nociceptivos, está o complexo de núcleos somatossensoriais, localizados no sistema nervoso central (SNC) na altura da ponte, denominados de núcleo sensorial principal (NSP) e núcleo do trato espinal (NTE) (CHICHORRO *et al.*, 2017; SHINODA *et al.*, 2019).

Com base em suas diferenças funcionais e de citoarquitetura, o NTE é subdividido em três subnúcleos trigeminais: oral (Vo), interpolar (Vi) e caudal (Vc) (CHICHORRO *et al.*, 2017), representados no ESQUEMA 1.



FONTE: O autor (2022).

ESQUEMA 1. Vias somatossensoriais da região orofacial. No gânglio do trigêmeo (GT) encontram-se os corpos celulares dos aferentes primários do nervo trigêmeo, os quais farão conexão com os neurônios de segunda ordem no núcleo do complexo sensorial no SNC. Esse complexo é composto pelo núcleo sensorial principal e núcleo do trato espinal, o qual subdivide-se em: Oral (Vo), Interpolar (Vi) e Caudal (Vc). A partir desses subnúcleos,

principalmente o Vc, os neurônios projetam-se para o tálamo e em seguida para diversas áreas cerebrais superiores envolvidas nos aspectos sensoriais (ex. córtex somatossensorial) e afetivo-motivacionais (ex. córtex pré-frontal, córtex cingulado anterior) da dor.

O Vc apresenta muitas características fisiológicas e morfológicas análogas ao corno dorsal da medula espinhal, e junto com o Vi recebem aferências nociceptivas trigêmino-cervicais que se projetam aos neurônios de terceira ordem, no tálamo, através do trato trigêminotalâmico ventral, e posteriormente ao córtex cerebral, local do processamento final da dor. Importante salientar que o córtex somatossensorial está relacionado aos aspectos sensoriais da dor, ao passo que o córtex pré-frontal e córtex cingulado anterior estão relacionados aos aspectos afetivo-motivacional da dor (CHICHORRO *et al.*, 2017; SHINODA *et al.*, 2019; ROTPENPIAN & YAKKAPHAN, 2021).

A região craniofacial é referida como o local mais prevalente de condições dolorosas agudas e crônicas, frequentemente associada a alterações psicoemocionais, o que de certa maneira dificulta o manejo clínico (CHICHORRO *et al.*, 2017). Assim, um melhor entendimento dos mecanismos subjacentes à transmissão nociceptiva e seu controle terapêutico, contribuem em conjunto para novas perspectivas no controle da sintomatologia dolorosa (CHICHORRO *et al.*, 2017).

## 1.2 DOR PÓS-OPERATÓRIA OROFACIAL

Estima-se que 80% dos pacientes que se submetem a procedimentos cirúrgicos apresentará dor pós-operatória (DPO), que está associada a lesão tecidual e/ou lesão nervosa, secundários ao procedimento cirúrgico propriamente dito (BACH *et al.*, 2018).

Dentre os fatores etiológicos envolvidos na DPO orofacial estão listados procedimentos cruentos, tais como: cirurgias periodontais, extrações dentárias, inserções de implantes dentários e traumas cirúrgicos (PORPORATTI *et al.*, 2015).

A patogênese da DPO orofacial envolve mecanismos periféricos e centrais de sensibilização neuronal, resultantes do rompimento da integridade tecidual, com subsequente instalação de processo inflamatório (KHAN *et al.*, 2019; KHOULY *et al.*, 2021).

No local da lesão tecidual ocorrerá a síntese e liberação de diversos mediadores inflamatórios, tais como: bradicinina, prostaglandinas, serotonina, adenosina trifosfato (ATP), fator de crescimento do nervo (NGF), histamina, dentre várias outras substâncias, que são capazes de ativar e/ou sensibilizar os nociceptores periféricos (JULIUS & BASBAUM, 2001).

Uma vez ativados, os aferentes primários irão liberar diversos neurotransmissores excitatórios (ex. glutamato, substância P e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina CGRP) que irão ativar periféricamente os nociceptores, bem como estimular os neurônios nociceptivos de segunda ordem no complexo sensorial trigeminal (CHICHORRO *et al.*, 2017).

Importante frisar que a ativação dos aferentes primários, não transmite apenas estímulos para os núcleos do trato espinhal e centros superiores, mas também inicia o processo de inflamação neurogênica, que é uma função eferente dos nociceptores e que resulta na amplificação do processo inflamatório (JULIUS & BASBAUM, 2001).

Assim, a dor aguda surge de maneira uníssona após procedimentos cirúrgicos (GLARE, 2019), e apresenta-se como mecanismo de proteção, com características fisiológicas e biológicas de alerta do sistema nervoso frente a um possível dano orgânico, e necessita imediata atenção do indivíduo (KHAN *et al.*, 2019).

Felizmente esta sintomatologia dolorosa aguda pode ser controlada na maioria das vezes, e resolve-se em torno de uma semana. Contudo determinado grupo de pacientes irá apresentar dor persistente após período de cicatrização/reparação tecidual, convergindo para um estado de cronificação da dor (GLARE, 2019).

De acordo com a Associação Dental Americana (sigla em inglês ADA) aproximadamente 15 milhões de pacientes nos Estados Unidos da América (EUA) são submetidos a tratamento endodôntico anualmente, e 20% deste grupo irá experimentar dor DPO nas semanas seguintes do procedimento e em torno de 10% irá desencadear dor persistente orofacial após esse tratamento (NOSRAT *et al.*, 2021).

Estima-se que mais de 320 milhões de pessoas sejam operadas anualmente e aproximadamente 10% destes indivíduos irão desencadear dor crônica pós-operatória. O controle inadequado da dor aguda pós-operatória (DAPO) parece contribuir significativamente para o processo de cronificação (GLARE, 2019; POGATZKI-ZAHN *et al.*, 2018).

Tal situação faz com que a DAPO seja considerada problema de saúde pública em sua própria essência (BREE *et al.*, 2015) e apesar da existência de protocolos clínicos/terapêuticos específicos no tratamento da dor, seu controle ainda permanece um grande desafio ao profissional de saúde (BACH *et al.*, 2018).

### 1.2.1 MODELO ANIMAL DE DOR PÓS-OPERATÓRIA OROFACIAL

O papel da especificidade das doenças estudadas em modelos animais está sendo cada vez mais reconhecido como um importante fator facilitador de translação para a clínica, neste sentido houve modificações em modelos originais para aumentar a especificidade e/ou estudar diferentes aspectos de uma doença (POGATZKI-ZAHN *et al.*, 2018).

Há mais de 20 anos foi desenvolvido o primeiro modelo de DPO incisional em ratos, avaliando desde aspectos comportamentais da dor, até possíveis mecanismos fisiopatológicos geradores deste processo (POGATZKI-ZAHN *et al.*, 2018).

Considerando as peculiaridades da região orofacial, Urata e colaboradores viram a necessidade de desenvolver um modelo específico de DPO orofacial no intuito de avaliar mecanismos e controle da dor nesta região (URATA *et al.*, 2015).

Através deste modelo foi constatada a diminuição da latência para reposta ao estímulo térmico relacionado ao calor e frio, assim como para o estímulo mecânico, aplicados na face. De acordo com Urata e colaboradores, a hiperalgesia facial induzida pela incisão da mucosa intraoral tem início 24 horas após o procedimento cirúrgico e persiste até os dias 3, 5 e 7, conforme o estímulo aplicado (calor, frio e mecânico, respectivamente; URATA *et al.*, 2015).

Dados do nosso grupo com este modelo corroboraram as observações de Urata e colaboradores, mostrando que após a incisão de mucosa intraoral ocorre hiperalgesia ao calor e hiperalgesia mecânica, com início no 1º dia pós-cirúrgico e que se estendeu até o 3º e 5º dias, respectivamente (ARAYA *et al.*, 2020<sup>a</sup>). Tanto a hiperalgesia térmica quanto a hiperalgesia mecânica foram significativamente reduzidas pelo tratamento sistêmico prévio com morfina, resultado que contribuiu para a validação farmacológica do modelo (ARAYA *et al.*, 2020<sup>a</sup>). Adicionalmente, nosso grupo evidenciou em modelo de DAPO por incisão intraoral que os animais desenvolveram comportamento do tipo-ansioso no dia 03 do pós-cirúrgico, como



consequência da persistência da dor (ARAYA *et al.*, 2020<sup>b</sup>), além da redução da emissão de vocalizações de 50 kHz, especificamente do subtipo *flat*, sugerindo desta maneira uma diminuição na comunicação social destes animais (ARAYA *et al.*, 2020<sup>b</sup>).

Assim, o modelo de DPO por incisão em mucosa oral já está bem caracterizado pelo nosso grupo e representa uma importante ferramenta para o estudo do componente sensorial e afetivo da dor orofacial (DOF), além de contribuir na investigação de fármacos com potencial analgésico.

### 1.3 CONTROLE FARMACOLÓGICO DA DOR PÓS-OPERATÓRIA OROFACIAL

Na prática clínica as principais recomendações para manejo da DAPO orofacial incluem a utilização de analgésicos opioides, analgésicos não-opioides (principalmente paracetamol), e/ou anti-inflamatórios não-esteroidais (AINES) (BREE *et al.*, 2015; BAILEY, 2018).

Os opioides pertencem a uma classe medicamentosa notadamente reconhecida para tratamento de condições dolorosas agudas relacionadas ao câncer, sendo considerados fármacos de primeira linha no controle de dores nociceptivas de moderada a severa intensidade e prontamente indicados em situações de lesões agudas traumáticas e/ou pós-cirúrgicas, sendo seu benefício já consagrado nestas situações (GROSS *et al.*, 2019; PATWARDHAN *et al.*, 2018).

Contudo, os opioides podem gerar inúmeros eventos adversos, dentre os quais destacam-se: sonolência, confusão mental, hiperalgesia, tolerância, dependência física, adição química, constipação, retenção urinária e depressão respiratória (PATWARDHAN *et al.*, 2018).

Abordagens terapêuticas inadequadas de analgesia por opioides e sobre prescrições médicas/odontológicas culminaram por deflagrar uma crise de opioides em escala crescente e vertiginosa ao caos, sem precedentes na história (NEUMAN *et al.*, 2019; WRIGHT *et al.*, 2014). Segundo dados da agência sanitária americana (sigla em inglês FDA, *Food and Drug Administration*) os maiores prescritores de opioides nos EUA em ordem crescente são: médicos do setor primário, intensivistas, cirurgiões-dentistas e cirurgiões ortopedistas (WRIGHT *et al.*, 2014).

O uso abusivo de opioides e a grande possibilidade de adição química/física relacionada a estes fármacos, em conjunto, são considerados problemas de saúde pública em países como EUA, Canadá e Austrália (RODRIGUE *et al.*, 2020; NEUMAN *et al.*, 2019).

O Centro de Prevenção e Controle de Doenças (sigla em inglês CDC) dos EUA divulgou que em 2019 houveram 70.630 mortes por overdose associado a opioides sintéticos, numa proporção de 21,6 óbitos para 100.000 habitantes, com aumento de 4,3% em comparação ao ano anterior (MATTSON,2021), além de que dados da Pesquisa Nacional sobre Uso de Drogas e Saúde (sigla em inglês NSDUH) estipulou que 4,3% da população de residentes deste país, ou seja, 11,1 milhões de habitantes, usaram prescrições de opioides para fins recreativos e sem propósitos médicos no ano de 2010 (WRIGHT *et al.*, 2014).

De maneira alarmante, as odontalgias de origem não traumática correspondem a 50,3% de todas as prescrições de opioides realizadas em unidades primárias de emergência nos EUA, isso faz com que as dores dentárias alavanquem de maneira ascendente a crise de opioides neste país (PATEL & AFSHAR, 2018).

Outra opção terapêutica são os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES), que inclusive ultrapassam os opioides em número de prescrições (KHAWAJA & RENTON, 2015), e são considerados fármacos com maior potencial de risco de automedicação e uso abusivo, devido à facilidade de aquisição sem receita (HÖRL, 2010).

Os AINES apresentam efeitos anti-inflamatórios, analgésicos e antipiréticos e atuam inibindo em diferente proporção as isoformas ciclooxygenase 1 e 2 (COX-1 e COX-2) e por consequência diminuem o processo inflamatório devido à inibição da síntese de prostaglandinas (HERSH *et al.*, 2008). Contudo, uma das principais limitações do emprego de inibidores da COX são os eventos adversos, relacionados principalmente ao aparelho gastrointestinal e efeitos cardiovasculares. Aproximadamente 20% dos pacientes não toleram tratamento com AINEs devido à toxicidade gastrointestinal, que pode gerar dor abdominal e diarreia. Os tratamentos por períodos prolongados são ainda mais preocupantes, pois estão associados a erosões e úlceras gástricas e duodenais, limitando desta maneira o benefício terapêutico (BATLOUNI, 2010). Ademais, os inibidores seletivos da COX-2 exercem importantes eventos adversos no sistema cardíaco, que incluem aumento do risco

de infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral e hipertensão arterial, devendo ser prescritos somente após avaliação do risco/benefício (BATLOUNI, 2010).

E finalmente, temos o analgésico paracetamol, uma das drogas mais empregadas no mundo no tratamento de febre e dor, notório por não apresentar atividade anti-inflamatória (MCGILL, 2013; KHAWAJA & RENTON, 2015). Contudo, seu mecanismo de ação ainda não está totalmente elucidado, e devido à sua atividade antipirética sugere-se que sua ação farmacológica esteja relacionada à inibição da COX no SNC (KHAWAJA & RENTON, 2015).

Adicionalmente, vários mecanismos têm sido propostos para explicar o seu potente efeito analgésico do paracetamol, dentre eles: 1) aumento dos níveis de canabinoides endógenos no SNC; 2) ativação da via descendente endógena da dor mediada por serotonina e 3) recrutamento do sistema opioide endógeno de controle da dor (JÓŹWIAK-BEBENISTA &, NOWAK, 2014).

Num estudo de revisão sistemática da Cochrane, foi evidenciado que o paracetamol se mostrou um efetivo analgésico quando utilizado no controle da DPO orofacial, com mínimos efeitos adversos (DODSON, 2007).

Em doses terapêuticas é considerado um fármaco seguro, contudo o uso inadvertido e diário em doses superiores a 4 g/dia pode causar lesão hepática grave que pode culminar em óbito (MCGILL, 2013). Anualmente em torno de 80.000 indivíduos nos EUA buscam atendimento médico por intoxicação pelo paracetamol, e em torno de 26.000 indivíduos deste grupo serão hospitalizados por hepatotoxicidade, com uma estimativa de 500 óbitos dentro dessa população (MCGILL, 2013).

Portanto, é premente a necessidade de desenvolver fármacos ou buscar alternativas para aliviar a sintomatologia dolorosa e promover efeitos terapêuticos em pacientes que sofrem de DAPO, que sejam mais seguras em comparação às opções terapêuticas atuais.

#### 1.4 SISTEMA OPIOIDE

O sistema opioide endógeno compreende quatro receptores acoplados à proteína G transmembrana, e são classificados segundo a IUPHAR/BPS (sigla em inglês para *The International Union of Basic and Clinical Pharmacology / British*

*Pharmacological Society*) como:  $\mu$ -opioides (MOP),  $\delta$ -opioides (DOP) e  $\kappa$ -opioides (KOP) e nociceptina orfanina (NOP) (IUPHAR/BPS). Embora produzam efeitos funcionais sutilmente diferentes, todos esses receptores exibem respostas celulares semelhantes após a ativação do receptor opioide (PATHAN & JOHN WILLIAMS, 2012). Esses receptores são capazes de se acoplarem à proteína  $G_{i/o}$  (inibitória) e ativar esta fração proteica. A proteína G se encontra num estado complexo trimérico, composto por três subunidades, a saber  $G\alpha$  (alfa),  $G\beta$  (beta) e  $G\gamma$  (gama). Desta maneira, quando ocorre a ligação do agonista opioide ao seu respectivo receptor, haverá a dissociação dessas frações, formando assim um complexo dimérico  $G\beta\gamma$  e individualização da fração  $G\alpha$ , que ficarão livres para interagir com as proteínas-alvo. Para realizar esta dissociação, se faz necessário a fosforilação de um tradutor de sinal, que é o trifosfato de guanosina (GTP), assim ocorrerá a transformação do difosfato de guanosina (GDP) em GTP e, sequencialmente, a tradução do sinal (CORDER *et al.*, 2018; PATHAN & JOHN WILLIAMS, 2012). Durante a etapa de ativação da proteína  $G_{i/o}$ , uma série sinalizações irão se suceder, que resultará na inibição da enzima adenilato ciclase com consequente redução da produção da adenosina 3,5-monofosfato cíclico (cAMP) e liberação de neurotransmissores excitatórios, tais como glutamato, substância P e CGRP. A subunidade  $G\beta\gamma$  irá interagir e ativar canais de potássio ( $K^{+1}$ ) dependentes de voltagem levando à hiperpolarização do nociceptor, e inibir canais de cálcio ( $Ca^{+2}$ ) da membrana plasmática, inibindo a neurotransmissão. Desta maneira, tais sinalizações hiperpolarizam a membrana neural e reduzem a condução do sinal, diminuindo assim a eficácia sináptica com consequente analgesia (WILLIAMS *et al.*, 2013).

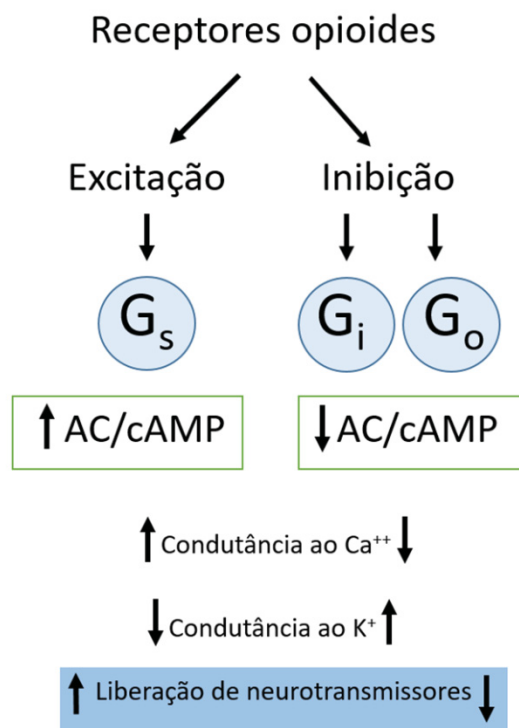
Contudo, a interação do agonista opioide ao receptor poderá ativar, de maneira paradoxal, uma segunda via, que é a excitatória. Desta maneira ocorrerá um aumento da formação da enzima adenilato ciclase e cAMP, além da ativação da proteína quinase A. Tais eventos provocarão a redução do influxo de potássio e aumento da condutância de íons cálcio e consequente liberação de neurotransmissores excitatórios e hipersensibilidade neuronal, conforme representado no ESQUEMA 2 (CORDER *et al.*, 2018; TOLJAN & VROOMAN, 2018).

Um exemplo clássico de ativação da via excitatória, pode advir do uso crônico do agonista opioide, capaz de gerar de maneira antagônica, quadro de hiperalgesia, caracterizando a hiperalgesia induzida por opioide. Neste caso, os agonistas

opioides são capazes de induzir alterações nas vias de modulação inibitórias e excitatórias nociceptivas, diminuindo o limiar doloroso e aumentando a sensibilidade à dor. Diversos mecanismos têm sido propostos para explicar esse fenômeno, tais como: facilitação das vias descendentes da dor, componente genético, facilitação da regulação intracelular do cálcio, mudanças no sistema glutamatérgico, sendo que este último representa a possibilidade mais evidente (LEE *et al.*, 2011).

Após a ativação, os receptores opioides são fosforilados por quinases de receptores acoplados à proteína G, levando ao recrutamento da  $\beta$ -arrestina 2 ou 3. As moléculas de arrestina são proteínas-chave que se ligam a estes receptores fosforilados para regular a sinalização da própria proteína G, por meio de dessensibilização e internalização do receptor (CORDER *et al.*, 2018; WILLIAMS *et al.*, 2013). Este fato é de extrema importância, pois se o receptor opioide for internalizado, a expressão destes receptores na membrana estará diminuída, sendo necessário uma dose muito maior do agonista opioide para obtenção do efeito analgésico adequado. No momento que este complexo é internalizado, ele poderá ser degradado no lisossoma e/ou reaproveitado por influência de fosfatases (CORDER *et al.*, 2018). Desta maneira a sinalização intracelular é encerrada quando a atividade endógena da GTPase, referente à subunidade  $G\alpha$ , hidrolisa o GTP para GDP. A fração  $G\alpha$  então se associa novamente com o heterodímero  $\beta\gamma$  para terminar a sinalização, transformando-o novamente num complexo trimérico. (SENESE *et al.*, 2020).

Assim, observamos duas situações distintas que ocorrem na fisiologia da ação do receptor opioide: 1) geração de um potencial pós-sináptico inibitório, com redução da eficácia sináptica, e como resultado atenuação da transmissão dolorosa e dor com menor intensidade. 2) geração de um potencial pós-sináptico excitatório, com aumento da eficácia sináptica e incremento da excitabilidade neural, resultando no aumento da intensidade dolorosa (TOLJAN & VROOMAN, 2018; CORDER *et al.*, 2018), além de que a ativação contínua dessas vias de sinalização, são capazes em promover alterações homeostáticas que resultam em tolerância e no estado de dependência do opioide (TRAYNOR, 2012).



FONTE: O autor (2022).

ESQUEMA 2. Vias de ação inibitórias e excitatórias dos receptores opioides. (AC: adenilato ciclase; cAMP: adenosina 3,5-monofosfato cíclico;  $\text{Ca}^{++}$ : cálcio;  $\text{K}^+$ : potássio).

Importante salientar que a atividade dos receptores opioides é modulada por uma família de proteínas sinalizadoras da proteína G (RGS) intracelulares, capazes de atuar como proteínas aceleradoras de GTPase (GAPs), com objetivo de desligar a sinalização pelas subunidades  $\text{G}\alpha$  e  $\beta\gamma$  das proteínas G. A atividade enzimática da GTPase da subunidade  $\text{G}\alpha_{i/o}$  é lenta (variável entre 2 a 5 minutos), não sendo rápido suficiente para permitir que uma célula responda a estímulos subsequentes. Neste contexto entra em ação a proteína RGS. Essas proteínas se ligam às regiões da  $\text{G}\alpha$ , que estão ligadas ao GTP, e atuam como proteínas aceleradoras da GTPase para aumentar a taxa de hidrólise do GTP em até aproximadamente 100 vezes. Este *switch* encurta drasticamente a vida útil das proteínas de sinalização  $\text{G}\alpha$ -GTP e  $\beta\gamma$  que estão ativas, resultando numa regulação negativa dos receptores acoplados à proteína G (SENESE *et al.*, 2020). Vários membros desta família, em particular RGS4 e RGS9-2 demonstraram influenciar a sinalização MOP e comportamentos induzidos por morfina, incluindo recompensa (TRAYNOR, 2012). Assim, a interação

entre as proteínas RGS e MOP sugerem a presença de vias bidirecionais, sendo que a sinalização do receptor opioide é modulada negativamente pela atividade da proteína RGS e pelo menos algumas proteínas RGS são, por sua vez, moduladas pela atividade de receptores MOP. As mudanças que as proteínas RGS causam em agonistas MOP, não somente servem para alterar a sinalização dos receptores MOP, mas também exibem potencial de regular a sinalização de receptores co-expressos com MOP, implicando diretamente na homeostase celular em resposta à exposição crônica por agonistas opioides (TRAYNOR, 2012; SENESE *et al.*, 2020). Em adição, existem evidências de que a naltrexona consegue reduzir a atividade da RGS4, o que pode contribuir com seu efeito farmacológico, por exemplo, no tratamento da adição (para revisão ver TRAYNOR, 2012).

### 1.5 NALTREXONA

A molécula naltrexona (NTX) (*17-(cyclopropylmethyl)-4,5 $\alpha$ -epoxy- 3,14-dihydroxymorphinan-6-one*) foi desenvolvida em 1963 e somente aprovada em 1984 pelo FDA. É um antagonista não seletivo de receptores opioides, com indicação para tratar pacientes dependentes físicos de álcool, aditos de heroína e usuários crônicos e/ou com histórico de abuso de medicamentos à base de opioides (KIM & FISHMAN, 2020; HATFIELD *et al.*, 2020).

Clinicamente prescrevem-se doses padrões que variam entre 50 até 150 mg/dia no intuito de tratar as indicações acima listadas. Contudo, quando utilizado em doses baixas (ex. entre 1,0 e 5,0 mg/dia), muito baixas (ex. entre 0,001 a 1 mg/dia) ou ultrabaixas (abaixo de 0,001 mg/dia), observa-se uma farmacodinâmica distinta, cuja curva dose-resposta não é linear com o incremento da dose, conforme representado na Tabela 2 (KIM & FISHMAN, 2020; HATFIELD *et al.*, 2020; TOLJAN & VROOMAN, 2018; WEBSTER, 2007; HAMANN *et al.*, 2004).

A atividade farmacológica da NTX em baixas doses (LDN sigla em inglês para *Low-Dose Naltrexone*) é considerada um exemplo de *hormesis*, situação em que um antagonista em baixa dose age de maneira paradoxal como um agonista fraco, enquanto que em doses elevadas atua como antagonista (KIM & FISHMAN, 2020).

Intervalo de Dose de NTX	Mecanismo de Ação	Uso Clínico
Dose padrão (50-100 mg) <b>(on label)</b>	Antagonista de receptor opioide	Aditos em drogas de abuso e álcool
Dose baixa (1- 5 mg) - LDN <b>(off label)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪Antagonista do TLR4</li> <li>▪Aumento da expressão de receptores opioides endógenos e exógenos</li> </ul>	Fibromialgia, esclerose múltipla, artrite reumatoide, diabetes tipo I, doença de Crohn, síndrome dolorosa complexa regional etc.
Dose muito baixa (0,001 – 1 mg) - VLDN <b>(off label)</b>	▪Possível similariedade com LDN	Possível similariedade com LDN
Dose ultrabaixa (<0,001 mg) - ULDN <b>(off label)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ A ULDN apresenta alta afinidade de ligação à proteína filamento-A presente nos receptores opioides, cuja interação promove redução da atividade da proteína Gs e prevalece a proteína Gi , com consequente analgesia</li> </ul>	Aumento do efeito antinociceptivo de opioides

TABELA 2. Diferentes intervalos de dose da NTX, possíveis mecanismos de ação relacionados e principais usos clínicos. (LDN: Low-Dose Naltrexone ; VLDN: Very-Low Dose Naltrexone; ULDN: Ultra-Low Dose Naltrexone). KIM & FISHMAN, 2020; HATFIELD *et al.*, 2020; TOLJAN & VROOMAN, 2018; WEBSTER, 2007; HAMANN *et al.*, 2004).

Esta resposta paradoxal faz com que a LDN apresente ação analgésica e anti-inflamatória (KIM & FISHMAN, 2020; HATFIELD *et al.*, 2020), cujo mecanismo de ação ainda não é totalmente esclarecido, mas as hipóteses atuais serão discutidas mais adiante.

Os primeiros relatos de caso sobre o uso da LDN no tratamento de doenças inflamatórias crônicas ocorreram em meados dos anos 80, contudo o primeiro estudo clínico controlado foi publicado somente em 2007, e desde então, seu uso tem sido estudado em inúmeras condições dolorosas crônicas (YOUNGER, 2014). Dentre os benefícios apontados para o uso da LDN é válido mencionar: baixo custo, segurança, tolerabilidade e eficácia analgésica.

Ainda não existem estudos experimentais completos que avaliem a farmacodinâmica da NTX em doses muito baixas (VLDN sigla em inglês para *Very-Low Dose Naltrexone*), contudo sugere-se características similares àquelas já descritas para a LDN (TOLJAN & VROOMAN, 2018).

Já, o uso da NTX em doses ultrabaixas (ULDN sigla em inglês para *Ultra-Low Dose Naltrexone*) é utilizado na clínica em associação com opioides potentes, tais como oxicodona e buprenorfina, principalmente no intuito de reduzir as chances de tolerância e abuso medicamentoso, assim como promover aumento do efeito analgésico de agonistas opioides (WEBSTER, 2007; HAY *et al.*, 2011).



Ademais, estudos experimentais demonstraram que a ULDN é capaz de potencializar o efeito analgésico dos gabapentinoides e canabinoides (PINEDA-FARIAS *et al.*, 2017; PAQUETTE & OLMSTEAD, 2005).

### 1.5.1 ASPECTOS FARMACOCINÉTICOS DA NTX

Em humanos, este fármaco apresenta excelente absorção por via oral, aproximadamente 96% ocorre no trato gastrointestinal, contudo sua biodisponibilidade pode variar entre 5% a 40% devido ao metabolismo de primeira passagem (PATTEN *et al.*, 2018; TOLJAN & VROOMAN, 2018).

O tempo de meia-vida é 4 horas, com ampla distribuição pelos diversos compartimentos do corpo, e sofre extensa metabolização hepática (>98%) pela enzima diidrodiol-desidrogenase, que originará o seu principal metabólito ativo, o 6- $\beta$ -naltrexol, que apresenta tempo de meia-vida de 13 horas. Importante salientar que a atividade farmacológica é atribuída tanto a NTX quanto ao seu metabólito ativo (PATTEN *et al.*, 2018; LIU *et al.*, 2014; TOLJAN & VROOMAN, 2018).

Existem ainda formulações de liberação controlada disponíveis para uso intramuscular, que resultam num aumento do tempo de meia-vida variável entre 5 a 10 dias. Os picos da concentração plasmática da NTX e 6- $\beta$ -naltrexol são detectados 1 hora após ingestão oral e ambos apresentam excreção primariamente renal (PATTEN *et al.*, 2018; TOLJAN & VROOMAN, 2018).

O ajuste de dose da NTX não é necessário frente a pacientes com leve comprometimento renal, contudo em pacientes com histórico de implicações renais de moderada a severa intensidade, precisa ser utilizado com cautela, visto que não há estudos clínicos que demostrem segurança (TROFIMOVITCH & BAUMRUCKER, 2019).

Em ratos, um estudo conduzido por Yoburn e colegas avaliou o perfil farmacocinético da NTX de liberação prolongada através de implante subcutâneo. Foi reportada elevada concentração plasmática na 1ª hora (350 ng/ml), biodisponibilidade em torno de 40%, tempo de meia vida de 4,6 horas e excreção predominantemente renal (YOBURN *et al.*, 1986).

Vale ressaltar que a naloxona (NLX) também é considerado um importante antagonista de receptores opioides, diferenciando-se da NTX principalmente pelo

tempo de meia-vida, que varia entre 30 minutos até 80 minutos, cujo principal metabólito ativo é o naloxona-3-glucoronídeo (TOLJAN & VROOMAN, 2018).

### 1.5.2 ASPECTOS FARMACODINÂMICOS DA NTX

O cloridrato de NTX é considerado um antagonista semissintético não-seletivo de receptores opioides, com maior afinidade por receptores MOP e menor afinidade pelos receptores DOP e KOP. (YOUNGER *et al.*, 2014; PATTEN *et al.*, 2018; TOLJAN & VROOMAN, 2018).

Estudos clínicos e experimentais têm revelado importantes propriedades anti-inflamatórias, imunomoduladoras e antinociceptivas relacionadas ao seu uso em baixas doses (HATFIELD, 2020; KIM & FISHMAN, 2020; TROFIMOVITCH & BAUMRUCKER, 2019). Existem várias hipóteses para o efeito antinociceptivo da LDN, sendo as mais aceitas, modulação do sistema opioide e antagonismo de receptores do tipo *opioid*, como descrito na sequência.

Tem sido demonstrado que após o uso crônico da LDN ocorre aumento da expressão de receptores opioides centrais e periféricos, favorecendo tanto a analgesia mediada por opioides endógenos (ex.  $\beta$ -endorfinas, encefalinas e dinorfinas) quanto por opioides exógenos (ex. codeína, tramadol, oxicodeona) (TOLJAN & VROOMAN, 2018; PATTEN *et al.*, 2018; TEMPEL *et al.*, 1985).

Gironi e colegas descreveram que o uso sistêmico de LDN em adultos, com esclerose múltipla, foi capaz de promover aumento dos níveis de  $\beta$ -endorfina de maneira progressiva após 1, 3 e 6 meses do uso deste fármaco, sendo que mesmo após descontinuação do tratamento farmacológico, os níveis endógenos de  $\beta$ -endorfina ainda permaneceram elevados durante aproximadamente um mês (GIRONI *et al.*, 2008).

Em ratos, a administração crônica de NTX na dose de 10 mg/Kg intraperitoneal (i.p.) por um período de 8 dias causou um aumento significativo da expressão de receptores opioides em quase duas vezes, nas mais diversas regiões cerebrais, favorecendo a analgesia por opioides endógenos e/ou exógenos (PATTEN *et al.*, 2018; TOLJAN & VROOMAN, 2018; TEMPEL *et al.*, 1985). Fato interessante, é que após a remoção do fármaco antagonista opioide, a densidade de receptores voltou ao padrão de normalidade no período de 6 dias (PATTEN *et al.*, 2018; TOLJAN &

VROOMAN, 2018; TEMPEL *et al.*, 1985). Corroborando essas observações, no estudo de Tempel e colegas, foi evidenciado que o uso crônico de NTX também resultou no aumento de analgesia induzida por morfina, além de aumentar a expressão dos receptores MOP e DOP (TEMPEL *et al.*, 1985). Contudo não foi observado nenhuma alteração significativa de aumento de expressão de receptores kappa-opioides, sugerindo desta maneira que a biossíntese e/ou degradação desses receptores sejam sujeitos a mecanismos regulatórios independentes (TEMPEL *et al.*, 1985). Esses achados, se comprovados na clínica, poderão permitir o uso de doses mais baixas de analgésicos opioides, quando associados à LDN, tornando o seu uso mais seguro e com menos efeitos adversos.

Outro possível mecanismo de ação da LDN, que poderia contribuir para seus efeitos antinociceptivos e anti-inflamatórios, é a modulação de receptores do tipo Toll (TLR) na micróglia, que será discutido no próximo tópico (YOUNGER *et al.*, 2014; TOLJAN & VROOMAN, 2018).

Ademais, em relação à ULDN, observa-se que o mecanismo de ação está relacionado a uma resposta celular bimodal dos opioides, ou seja, a proteína  $G_s$  que ativa a adenilato ciclase, está envolvida com o aumento da resposta celular, ao passo que a proteína  $G_i$  é responsável pela mediação dos efeitos inibitórios de receptores MOP na via adenilato ciclase. Assim, tanto os efeitos excitatórios como inibitórios, estão na dependência de altas ou baixas doses, respectivamente, do agonista opioide utilizado (HAMANN *et al.*, 2004; TOLJAN & VROOMAN, 2018).

Desta maneira, baixas doses de opioides podem causar um prolongamento do potencial de ação (PPA), desencadeando um efeito excitatório, contudo em doses terapêuticas reduzem o PPA no gânglio da raiz dorsal e conseqüentemente diminuem a excitabilidade neuronal e transmissão de impulsos nociceptivos. Diante disso, sugere-se que a ULDN seja capaz de bloquear o prolongamento excitatório deste potencial de ação (WEBSTER, 2007).

Importante frisar que o principal componente mediador dos segundos mensageiros relacionado aos receptores MOP é a proteína Filamina-A (sigla em inglês FLNA), que apresenta um sítio de ligação com alta afinidade pela ULDN (3.94 pM). Quando há ligação entre ULDN e FLNA, ocorre uma mudança no mecanismo de sinalização dos receptores MOP acoplados à proteína  $G_s$ , os quais são atenuados, prevalecendo desta maneira a resposta inibitória aos receptores  $G_i$ , favorecendo assim a potencialização do efeito analgésico dos opioides e redução de

efeitos adversos, tais como hiperalgesia, tolerância e dependência (TOLJAN & VROOMAN, 2018). No entanto, a FLNA também contém um sítio de ligação de baixa afinidade para ULDN (834 pM). Se ambos os sítios de ligação estiverem saturados, o perfil favorável da sinalização dos receptores MOP é abolido. Estes sítios de afinidade determinam o intervalo em que a ULDN possa ser clinicamente relevante para impulsionar a resposta a agonistas de receptores MOP (TOLJAN & VROOMAN, 2018).

### 1.5.3 RECEPTORES TLR4

Os receptores TLR são classificados como receptores tirosina quinase e formam uma parte do sistema imune inato, considerado primeira linha de defesa do organismo, e estão envolvidos tanto na iniciação da resposta imunológica inata, como também no desenvolvimento de respostas imunes adaptativas (LI *et al.*, 2016).

Até o presente momento, foram identificados e descritos 13 tipos de TLR em mamíferos, sendo o receptor TLR4 o mais estudado, além de representar o principal alvo de ação da LDN (PŁÓCIENNIKOWSKA *et al.*, 2015; TROFIMOVITCH & BAUMRUCKER, 2019).

A ativação dos receptores TLR4 ocorre através dos Padrões Moleculares Associados a Danos (DAMP) e dos Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMP), presentes principalmente nos macrófagos, nos monócitos e na micróglia (LI *et al.*, 2016; CANT, 2017). Ademais, o TLR4 é ativado pelo Lipopolissacarídeo de *Pseudomonas Aeruginosa* (LPS), um componente externo da membrana de bactérias Gram-negativas, capaz de induzir a produção de mediadores pró-inflamatórios e algôgenicos no hospedeiro (PŁÓCIENNIKOWSKA *et al.*, 2015).

A sinalização do TLR4 é iniciada por transferência de um monômero LPS da proteína de ligação LPS (LBP) e CD14 para a co-proteína acessória do fator de diferenciação mielóide-2 (MD2), que funciona como um co-receptor extracelular do TLR4, o qual está relacionado ao reconhecimento do agente ligante. A ligação do LPS ao MD2 resulta na dimerização de dois complexos TLR4/MD2, que levam a ativação de duas grandes vias de sinalização, uma das quais depende do MyD88 (*Myeloid Differentiation Primary Response Gene 88*), enquanto a outra depende da proteína de adaptação TRIF (*TIR domain-containing adaptor inducing interferon-β*)

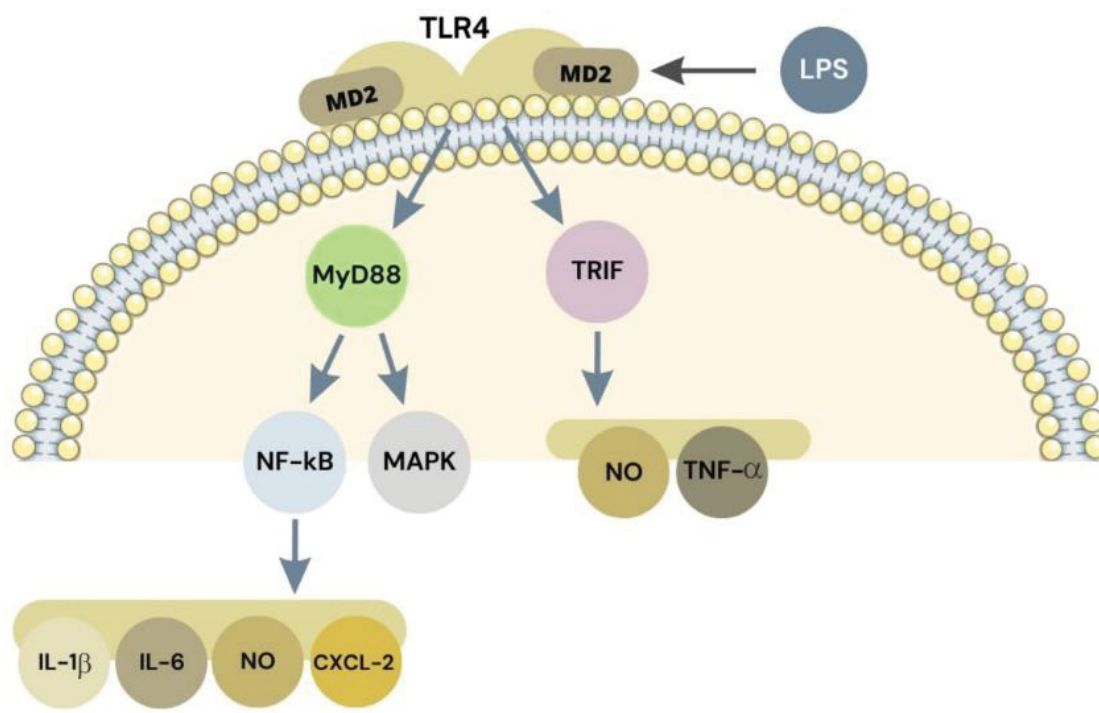
sendo que TIR significa *Toll/Interleukin-1 Receptor* (LIN *et al.*, 2021). A via de sinalização dependente de MyD88 leva à ativação antecipada de NF- $\kappa$ B e MAPKs (*Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinases*) e promove indução da expressão de diversos mediadores inflamatórios, tais como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e CXCL2, contudo a via de sinalização TRIF-dependente resulta em diminuição e atraso na ativação do NF- $\kappa$ B (ESQUEMA 3) LIN *et al.*, 2021).

Existem inúmeras evidências da contribuição dos receptores TLR4 em condições de dor inflamatória (XU *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2016; KONG *et al.*, 2016).

Nesse sentido, um estudo do nosso grupo mostrou que a administração intraganglionar de um antagonista de receptores TLR4 (LPS-RS) foi capaz de reduzir a hiperalgesia térmica e mecânica na face induzidas por incisão da mucosa intraoral ou injeção de LPS na mucosa. Ademais, foi demonstrado que a ativação das vias de sinalização mediada por receptores TLR4 no GT contribuem para o desenvolvimento da hiperalgesia mecânica e térmica orofaciais associadas à inflamação (ARAYA *et al.*, 2020<sup>a</sup>).

Durante o processo inflamatório ocorre aumento da expressão do TLR4 em células gliais, o que acarreta na manutenção do estado ativo destas células, gerando a liberação e produção de citocinas, quimiocinas e neuropeptídeos; que contribuem para o estado hiperalgésico (HATFIELD, 2020). Desta maneira, a ativação de células gliais implica em neuroinflamação, mudanças nociplásticas e hipersensibilidade dolorosa.

Alguns estudos demonstram a habilidade da ULDN ou NLX em reduzir processos neuroinflamatórios através da redução citocinas pró-inflamatórias e NO em culturas gliais induzidas por LPS, inibindo desta maneira a ativação glial. Ademais, ensaios moleculares indicam a capacidade da ULDN em impedir o acoplamento do receptor opioide à proteína G<sub>s</sub> (LIU & HONG, 2003; TSAI *et al.*, 2008; MATTIOLI *et al.*, 2010). Contudo, surge necessidade de esclarecer os mecanismos subjacentes relacionados ao efeito analgésico da ULDN no modelo de dor pós-operatória orofacial.



FONTE: O autor (2022).

ESQUEMA 3. Vias de sinalização do TLR4. Após ligação por LPS, o dímero TLR4-MD2 ativará duas principais vias de sinalização, MYD88 e TRIF, e por consequência liberação de mediadores pró-inflamatórios. A via NF-κB irá liberar os seguintes mediadores: IL-1 $\beta$ , IL-6, NO e a quimiocina CXCL-2, ao passo que a via TRIF irá liberar o NO e TNF- $\alpha$ .

#### 1.5.4 EVIDÊNCIAS CLÍNICAS DO EFEITO ANALGÉSICO DA NTX

Variados são os estudos clínicos que versam sobre os benefícios da LDN em condições neuroimunes e inflamatórias crônicas, tais como: fibromialgia, esclerose múltipla, artrite reumatóide, diabetes tipo I, doença de Crohn, síndrome dolorosa complexa regional, dentre outras (LI *et al.*, 2018; TROFIMOVITCH & BAUMRUCKER, 2019). Nestas condições sugere-se que a ativação glial, via TLR4, e subsequente produção de fatores pró-inflamatórios, contribuam para a perpetuação da condição dolorosa (YOUNGER, 2014; HATFIELD *et al.*, 2020).

Ademais, tem sido observado que antagonistas opioides promovem bloqueio de receptores MOP acoplados à proteína G<sub>s</sub> e quando utilizados em baixas doses

diminuem os efeitos excitatórios centrais, tais como prurido, náusea e vômito (CRAIN, 1996; WANG *et al.*, 2005; CHINDALORE *et al.*, 2005). Por esta razão também são utilizados em associação com agonistas opioides (ex. morfina) no intuito de reduzir tais efeitos adversos (VASQUENZA *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2005; FIROUZIAN *et al.*, 2020).

Contrário das inúmeras evidências clínicas da utilização da LDN, tanto o uso NTX ou NLX em doses inferiores a 1000 ng ainda são recentes e escassos.

A primeira menção clínica sobre ULDN foi descrita por Cruciani e colegas para tratamento de polineuropatia diabética em paciente refratário a tratamentos convencionais. Somente a utilização da ULDN em associação à metadona promoveu grande alívio na sintomatologia dolorosa, melhora de humor e qualidade de vida, além de cessar a náusea ocasionada pelo uso crônico da metadona (CRUCIANI *et al.*, 2003). Sequencialmente, foi testado por Zylicz e colegas o uso de doses ultrabaixas de NLX no intuito tratar colestase prurítica grave, num paciente oncológico terminal, que resultou em importante melhora clínica do prurido, além da qualidade de vida (ZYLICZ *et al.*, 2005).

Desde então surgiram alguns ensaios clínicos para avaliar o uso simultâneo de opioide com ULDN ou NLX em doses ultrabaixas, no tratamento de dores aguda pós-operatória e algumas dores crônicas de cunho neuroinflamatório.

Neste contexto foi realizado estudo fase II randomizado e controlado em pacientes portadores de osteoartrite crônica (n=360) com dor de moderada a severa intensidade, que avaliou a associação de oxicodona com ULDN. Foi observado que esta associação produziu redução de 39% do alívio sintomatológico quando comparados ao placebo ou a monoterapia pelo opioide (CHINDALORE *et al.*, 2005).

Em continuidade, Webster e colegas conduziram estudo fase III duplo-cego, randomizado e placebo controlado em pacientes portadores de dor lombar crônica (n=719), que avaliou a associação de oxicodona com ULDN. A combinação destes fármacos além de promover maior analgesia, também reduziu em 55% a dependência física dos pacientes quando comparados ao uso isolado da oxicodona (WEBSTER *et al.*, 2006).

Estudo clínico randomizado avaliou a intensidade da DAPO em indivíduos (n=72) submetidos a cirurgia aberta coloretal que utilizaram infusão de NLX em baixas doses associado ao remifentanil. Foi observado além de promover analgesia superior, a NLX impediu a tolerância aguda pelo opioide, assim como propiciou

rápida função da motilidade intestinal e redução do tempo de internação hospitalar (XIAO *et al.*, 2015).

Ensaio duplo-cego foi avaliado os benefícios de uma única dose intratecal (i.t.) de NLX em pacientes (n=77) submetidos à laminectomia lombar com fusão espinhal. A administração de NLX em dose ultrabaixa reduziu o escore de dor, prurido e náusea quando comparado apenas com a utilização de morfina i.t (FIROUZIAN *et al.*, 2020).

Ainda permanece uma lacuna em relação a estudos clínicos, por não testarem a ULDN de maneira isolada no controle da DAPO nas diversas condições cirúrgicas, em particular na orofacial, apesar de existirem muitas evidências da associação terapêutica com potentes agonistas opioides para controle algico, principalmente no intuito de incrementar analgesia e reduzir efeitos adversos pertinentes aos opioides.

#### 1.5.5 EVIDÊNCIAS PRÉ-CLÍNICAS DO EFEITO ANALGÉSICO DA NTX

Estudos recentes mostraram o potencial analgésico da LDN em modelos de dor inflamatória e neuropática orofacial. Em recente pesquisa desenvolvida por de Oliveira e colegas (2020) foi avaliado o efeito analgésico da LDN frente a alodinia mecânica facial num modelo de dor neuropática induzida por constrição de nervo infraorbital. Nesse estudo foi demonstrado que a NTX (0,5 mg/kg, i.p.) foi capaz de reverter a hiperalgesia causada pelo estímulo mecânico, de maneira similar ao tratamento com carbamazepina, considerado padrão ouro para o tratamento da dor associada à neuralgia do trigêmeo (de OLIVEIRA *et al.*, 2020). Outro estudo recente em modelo de artrite induzida em articulação temporomandibular de ratos, demonstrou que a NTX (10 mg/kg, i.p.), promoveu importante efeito analgésico, diminuindo o processo inflamatório e também a erosão da cartilagem articular, além de inibir as vias de sinalização do TLR4 e NF-κB (Fator Nuclear Kappa-B) (XU *et al.*, 2020). Esses dados são corroborados por estudos *in vitro* que mostram o potencial da LDN de inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias através da ação antagonista nos receptores TLR4 (YOUNGER *et al.*, 2014; TOLJAN & VROOMAN, 2018).

Adicionalmente, inúmeros estudos têm reportado que a associação de ULDN com morfina resultam em potencialização do efeito analgésico (POWELL, 2002;



ABUL-HUSN *et al.*, 2007; HAMANN *et al.*, 2004). Nesse sentido, Powell e colegas administraram NTX (0,05 e 0,1 ng/10  $\mu$ L, i.t.) ou NTX (10 ng/Kg, i.p.) associado com doses subterapêuticas agudas de morfina e observaram que houve aumento do efeito antinociceptivo nos ratos através do teste de retirada da cauda (POWELL, 2002). Corroborando este estudo, Abul-Husn e colegas mostraram que a associação de ULDN (variáveis de 5 a 15  $\mu$ g, i.t.) com morfina em dose subterapêutica resultaram em potencialização do efeito analgésico no teste de latência de retirada de cauda e no teste de pressão de pata (ABUL-HUSN *et al.*, 2007). Resultados semelhantes quanto à analgesia também foram obtidos por Hamann e colegas (2004) quando associaram ULDN (2  $\mu$ g/Kg, i.p.) e morfina (2 mg/Kg, i.p.), mostrando que a NTX aumentou o efeito analgésico da morfina, além de que a analgesia se mostrou superior em ratos machos, quando comparados às fêmeas (HAMANN *et al.*, 2004).

A administração i.t. de ULDN (variáveis de 0.025 a 0.5 ng/10 $\mu$ L) produziu efeito antialodínico dose-dependente em ratos com dor neuropática induzido por lesão nervosa espinal, cuja duração analgésica durou aproximadamente 8 horas (PINEDA-FARIAS *et al.*, 2017). Ademais, a associação de pregabalina 30 mg/Kg (v.o.) ou gabapentina 300 mg/Kg (v.o.) com ULDN (i.t.) promoveu interação sinérgica entre as drogas, com redução da alodinia mecânica induzida por ligadura em nervo espinal, além de redução da quantidade de fármacos administrados, visto que o co-tratamento com NTX reduziu em 30 vezes as doses de pregabalina e gabapentina necessárias para a obtenção de efeito analgésico significativo (PINEDA-FARIAS *et al.*, 2017).

Até a presente data, não há na literatura estudos experimentais que abordem a utilização da ULDN em situações agudas de DPO, o que nos encorajou a explorar essa alternativa. Considerando os dados da literatura atual, nossa hipótese é que a ULDN possa apresentar ação analgésica em modelo de DPO orofacial, causando redução significativa da hiperalgesia térmica e mecânica neste modelo, assim como inibir da produção de citocinas pró-inflamatórias através do antagonismo de receptores TLR4.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste estudo foi avaliar o potencial efeito antinociceptivo da ULDN em modelo de dor pós-operatória orofacial, bem como investigar possíveis mecanismos de ação relacionados a esse efeito.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

✓ Caracterizar o decurso temporal da hiperalgisia térmica após a incisão intraoral em ratos machos e fêmeas;

✓ Avaliar o efeito antinociceptivo da NTX, administrada sistemicamente na hiperalgisia térmica em ratos machos e fêmeas e mecânica, em ratos machos, no modelo de dor pós-operatória orofacial;

✓ Avaliar o efeito da associação da NTX com morfina em modelo de dor pós-operatória orofacial;

✓ Avaliar o efeito da NTX administrada na mucosa oral, no GT e Vc na hiperalgisia térmica no modelo de dor pós-operatória orofacial;

✓ Avaliar o efeito antinociceptivo da NTX após bloqueio dos receptores TLR4 no GT e Vc em modelo de dor pós-operatória orofacial;

✓ Avaliar o efeito antinociceptivo da NTX na hiperalgisia orofacial induzida por LPS;

✓ Avaliar a influência da NTX nos níveis de citocinas pró-inflamatórias no GT em ratos machos submetidos à injeção de LPS na mucosa oral ou ao modelo de dor pós-operatória orofacial;

✓ Avaliar a influência da NTX na viabilidade celular, liberação de NO e de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos estimulados com LPS.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAL

##### 3.1.1 Animais

Foram utilizados ratos *Rattus Norvegicus* variedade Wistar, machos e fêmeas, pesando entre 200-260 g, com idade em torno de 8 semanas, provenientes do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, mantidos em condições controladas de temperatura ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas), com livre acesso a ração e água antes dos experimentos. No mínimo 3 dias antes dos experimentos, os animais foram transferidos do biotério para a sala de ambientação e agrupados em um número máximo de 5 animais por caixa. Os experimentos foram realizados em sala silenciosa, mantendo o controle da temperatura e sempre durante a fase clara do ciclo. Todos os protocolos utilizados neste estudo somente foram iniciados após aprovação da Comissão de Ética para o Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR, autorização n° 1263) conforme ANEXO 1.

##### 3.1.2 Drogas

- Cloridrato de Naltrexona (Tocris Bio-techne, USA)
- Sulfato de morfina (Merck S.A, São Paulo, Brasil)
- Cloridrato de Quetamina (Quetamina®, Vetnil Indústria e Comércio de Produtos Veterinários Ltda., Louveira, SP, Brasil)
- Cloridrato de Xilazina (Xilasin®, Syntec Tecnologia Farmacêutica Aplicada à Medicina Veterinária, Santana de Parnaíba, SP, Brasil)
- Solução salina estéril 0,9% (Equiplex Indústria Farmacêutica, Aparecida de Goiânia, GO, Brasil);
- Lipopolissacarídeo (LPS) de *Pseudomonas Aeruginosa*, agonista de receptor TLR4 (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA*);
- LPS-RS, antagonista de receptor TLR4 (InvivoGen, San Diego, CA, USA).

A NTX foi diluída em solução salina estéril e as doses utilizadas no presente estudo foram baseadas nos trabalhos de Mattioli *et al* (2010) Hamann *et al* (2004). A

morfina foi diluída em solução salina estéril e a dose utilizada foi baseada nos trabalhos de Hamann e colegas (2004) e Araya e colaboradores (2020<sup>a</sup>). Tanto o LPS quanto o LPS-RS foram diluídos em solução salina estéril e as doses preconizadas basearam-se no estudo de Araya e colaboradores (2020<sup>a</sup>).

## 3.2 MÉTODOS

### 3.2.1 Modelo de dor pós-operatória orofacial

Esse método foi descrito previamente por Urata e colaboradores (2015) e modificado por Araya *et al* (2020<sup>a</sup>). Inicialmente, o animal foi contido e profundamente anestesiado com uma injeção i.p. de quetamina e xilazina (50 mg/Kg e 10 mg/Kg, respectivamente). Para incisão da mucosa bucal o animal foi posicionado lateralmente em bancada cirúrgica para inserção de um dispositivo intraoral, capaz de manter sua boca aberta durante todo procedimento. Foi utilizada uma lâmina de bisturi n°5 para realização de uma incisão intraoral no lado direito do animal, com as seguintes dimensões: profundidade de 2 mm e comprimento de 10 mm. Após esse procedimento, o corte foi suturado com fio de seda 4-0 com apenas um único ponto no meio da incisão. O animal falso-operado passou por todas as etapas, porém não se realizou incisão e sutura. Finalizada cirurgia, os animais foram gentilmente colocados em caixa de ambientação e monitorados em sala aquecida até completa recuperação.

### 3.2.2 Avaliação da hiperalgesia térmica orofacial

Neste teste, os animais foram contidos gentilmente pela mão do experimentador e em seguida foi posicionada uma fonte de calor radiante (~50°C) aproximadamente a 1 cm de distância da área de inserção das vibrissas, conforme descrito por Chichorro e colaboradores (2009). Em seguida, foi registrado o tempo de latência para que os animais iniciassem movimentos bruscos de esquiva com a cabeça na tentativa de fugir da fonte térmica ou apresentassem movimentos rápidos e consecutivos com as vibrissas. O tempo de corte para exposição ao calor foi de 20 segundos, no intuito de evitar danos teciduais.

### 3.2.3 Avaliação da hiperalgesia mecânica orofacial

Primeiramente os animais foram ambientados individualmente em caixas de observação, por um período de 2 horas. Após ambientação foi realizado a pré-seleção, que consistiu na aplicação crescente de 8 filamentos de von Frey (*Semmes-Weinstein monofilaments*, Stoelting, USA: 0,04; 0,07; 0,16; 0,4; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 g) de forma crescente próximo da região de vibrissas. Cada filamento foi aplicado por 3 vezes, num intervalo de 3 segundos entre cada aferição. O limiar de resposta foi considerado quando o estímulo do filamento de von Frey deflagrou ao menos duas vezes comportamentos aversivos de esquiva rápida de cabeça e reações de ataque e/ou escape (CHICHORRO *et al.*, 2006).

Durante a pré-seleção, os animais que apresentaram respostas aversivas durante a aplicação de quaisquer um dos filamentos de von Frey foram excluídos do estudo. Já durante a sessão teste, os animais selecionados passaram pelo mesmo protocolo da pré-seleção (ambientação e aplicação dos 8 filamentos de von Frey), e foi considerada hiperalgesia mecânica uma redução significativa do limiar de resposta.

### 3.2.4 Injeção na mucosa oral

O protocolo infiltrativo em mucosa oral foi realizado conforme descrito previamente por Araya e colaboradores (ARAYA *et al.*, 2020<sup>a</sup>). Os animais foram gentilmente contidos pela mão do pesquisador e anestesiados com halotano à 4% por via inalatória. Após anestesia, os animais foram posicionados em decúbito lateral em uma bancada e a boca foi mantida aberta para proporcionar uma melhor visualização da região intraoral. As substâncias foram injetadas na mucosa direita ipsilateral ao local da incisão, num volume de 30 µL utilizando agulha de 31-Gauge (0,25x6 mm) conectada a uma seringa hipodérmica de 1 mL.

### 3.2.5 Injeção medular subaracnóidea

O procedimento de injeção no espaço medular subaracnóide foi realizado de acordo com a técnica padronizada por Fischer e colaboradores (2005) com os animais sob anestesia inalatória de halotano a 4% e posicionados dorsalmente em bancada. Após indução anestésica realizou-se a tricotomia em área previamente delimitada e localizada acima da região cervical superior. Foi utilizada uma agulha de 30-Gauge (0,3x8 mm) conectada a uma seringa Hamilton de 25 µL através de um cateter de polietileno, esta agulha foi inserida abaixo do osso occipital a uma profundidade de até 4 mm e leve inclinação em direção craniana. Posteriormente, a agulha foi introduzida por mais 2 mm para perfurar a membrana atlanto-occipital e atingir o espaço medular subaracnóideo. Após o procedimento a agulha foi cuidadosamente removida e os animais cuidadosamente alocados em caixas de ambientação e monitorados até a recuperação. Esta técnica permite a administração de drogas que serão perfundidas no fluido cérebro-espinhal em região de Vc (ARAYA *et al.*, 2017).

### 3.2.6 Injeção no GT

A injeção intraganglionar foi realizada conforme descrito por Neubert e colegas (2005) com mínimas modificações (ARAYA *et al.*, 2017). Previamente os animais foram anestesiados com solução de halotano 4% e posicionados em bancada em decúbito ventral. Foi utilizada uma agulha de 27-Gauge (0,4x30 mm) conectada a uma seringa Hamilton de 25 µL através de um cateter de polietileno. A agulha foi posicionada em um ângulo aproximado de 10° relativo à linha mediana da cabeça e inserida pelo forame infraorbital e por continuidade atravessando o forame redondo até atingir as proximidades do GT. Após o procedimento a agulha foi cuidadosamente removida e os animais acondicionados em caixa de observação para serem monitorados até despertarem completamente da ação anestésica. Os experimentos foram realizados somente após extensivo treinamento da injeção e confirmação do acerto do sítio alvo através do uso de corante de azul de Evans.

### 3.2.7 Ensaio imunoenzimático de ELISA para detecção de citocinas

As regiões correspondentes ao GT e Vc (ipsilaterais) foram coletados e homogeneizados em 600 µL de tampão de lise (RIPA) contendo inibidores de proteases por 40 segundos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 20 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram coletados e transferidos para novos tubos, sendo utilizados para a dosagem das citocinas, conforme descrito por SHINODA *et al.*, 2011 e LATRÉMOLIÈRE *et al.*, 2008.

A liberação das citocinas foi quantificada pelo ensaio de imunoabsorbância ligado a enzima (ELISA). Placas de 96 poços foram cobertas com 100 µL/poço, com anticorpos de captura para cada citocina de acordo com as instruções do fabricante (DuoSet ELISA, R&D Systems). As placas foram deixadas à temperatura ambiente, *overnight*. Depois foram lavadas com o tampão de lavagem por três vezes, processo repetido antes de cada etapa. Foram adicionados 300 µL do tampão de bloqueio a cada poço. As placas foram incubadas por 1 hora e foram acrescentados 100 µL das amostras ou das soluções-padrão.

Após incubação à temperatura ambiente por 2 horas, 100 µL do anticorpo de detecção foram adicionados aos poços. Após nova incubação por 2 h em temperatura ambiente, 100 µL de uma solução de conjugado de avidina foi adicionada em cada poço. Após 20 min, 100 µL de solução para substrato foi adicionado. As placas foram incubadas por mais 20 minutos, e em seguida adicionou-se a solução de *Stop*. A reação colorimétrica foi lida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 405 nm com correção de 570 nm.

As concentrações das citocinas IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e Substância P (SP), foram expressas em pg/mL, estabelecida através de uma correlação entre os dados das absorvâncias e a curva de calibração determinada pelo fabricante.

### 3.2.8 Avaliação de viabilidade celular, liberação de NO e dosagem de citocinas em macrófagos estimulados com LPS

Para cultura celular foram utilizados macrófagos de ratos (RAW 264.7 transfectadas com gene repórter de NF- $\kappa$ B) imortalizados. As células foram cultivadas em meio de *Roswell Park Memorial Institute / culture medium* (RPMI)

suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (FBS), bicarbonato de sódio (1500 mg/L), penicilina (100 U/mL) estreptomicina (100 µg/mL) e gentamicina (10 µg/mL). As células foram mantidas em frascos para cultura de tecidos (75 mm<sup>2</sup>) e em uma estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Os experimentos foram conduzidos utilizando uma confluência de aproximadamente 80%.

Dando sequência para análise de citotoxicidade por redução do brometo de 3,4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio (MTT), as células RAW 264.7 (1x10<sup>5</sup> células/poço) foram transferidas para a placas de cultura de células com 96 poços. As formulações de NTX foram diluídas em meio de cultura, e as células foram expostas aos tratamentos por 24 h. O meio RPMI 10% FBS foi utilizado como controle. As células foram expostas a concentrações crescentes das formulações (0,1 ng/mL, 1 ng/mL e 10 ng/mL) com o objetivo de determinar a IC<sub>50</sub>. Terminados os períodos de incubação, a citotoxicidade foi verificada através do ensaio de redução do MTT, conforme descrito por LAZARINI *et al.*, 2020 e FERREIRA *et al.*, 2018. Os poços foram lavados com Tampão Salina Fosfato (PBS) (pH 7,4) e foi adicionado 200 µL de *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) contendo 0,5 mg/mL de MTT. As células foram incubadas por 4h, e em seguida, o meio foi removido e 100 µL de álcool absoluto foi adicionado aos poços para dissolver os cristais de formazan. O conteúdo dos poços foi homogeneizado e a absorbância foi medida em um leitor de microplacas com comprimento de onda de 540 nm. A viabilidade celular foi expressa em porcentagem em relação ao controle. Foram realizados três experimentos independentes com nove repetições para cada concentração.

Em seguida, foi realizado o ensaio de liberação de NO, protocolo utilizado para avaliar *in vitro* os efeitos anti-inflamatórios da NTX. As células RAW 264.7 (1x10<sup>5</sup> células/poço) foram transferidas para as placas de 96 poços e tratadas com NTX. As placas foram incubadas por 1 h (37°C e 5% CO<sub>2</sub>) e posteriormente estimuladas com LPS de *E. coli* sorotipo (O111:B4) na concentração de 1 µg/mL. As placas então foram incubadas por 24 horas na temperatura de 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. O controle positivo foi realizado com células tratadas apenas com LPS. Células não estimuladas com LPS foram utilizadas como controle negativo.

Terminados os períodos de incubação, a produção de NO foi determinada pela presença de nitritos no sobrenadante da cultura de células através do reagente de Griess, conforme descrito por LAZARINI *et al.*, 2020 e FERREIRA *et al.*, 2018 e



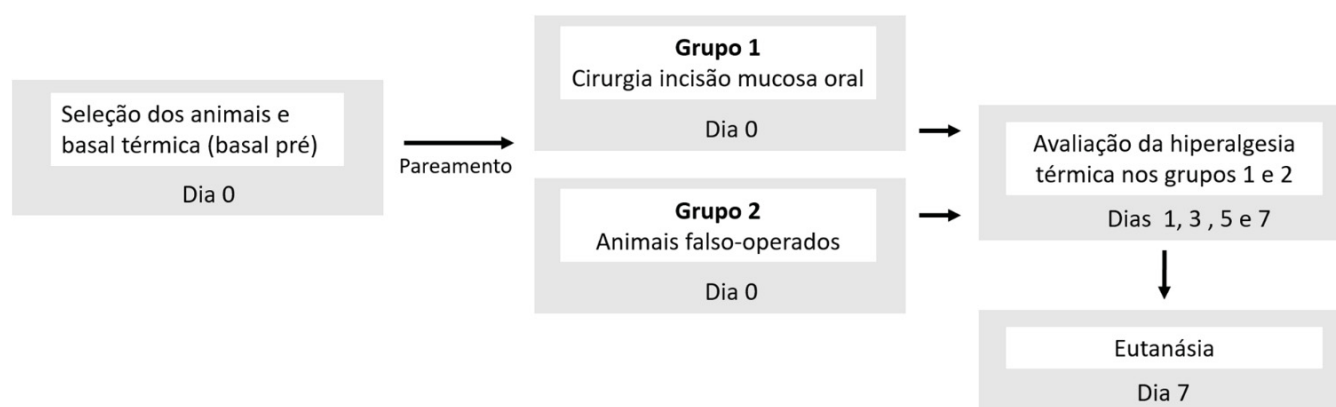
seguindo as instruções do fabricante (Promega). Os resultados foram expressos em milimolar (mM) de NO liberado.

Para avaliação da liberação de mediadores pró-inflamatórios, as células RAW 264.7 foram cultivadas como descrito anteriormente e transferidas para placas de cultura de células de 96 poços (2x10<sup>5</sup> células/poço) e incubadas por 24 h a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. As células foram tratadas com NTX na concentração de 0,1 ng/mL. Após 1 h foi adicionado 100 ng/mL de lipopolisacarídeo (LPS) de E. coli sorotipo (O111:B4) seguido de incubação por 4 h. Os sobrenadantes foram coletados para a dosagens dos níveis das citocinas TNF- $\alpha$  e da quimiocina CXCL-2/MIP-2. Os sobrenadantes da cultura de células incubadas por 24 horas foram utilizados para a dosagem de IL-1 $\beta$ . A quantificação das citocinas foi realizada utilizando kits de ELISA (DuoSet, R&D System), de acordo com os protocolos fornecidos pelo fabricante. Os resultados foram expressos em pg/mL, comparando os níveis de citocinas antes da estimulação e após a estimulação com LPS.

### 3.2.9 Protocolos experimentais

**Experimento 1:** Avaliação do decurso temporal da hiperalgesia térmica em ratos fêmeas e machos após incisão intraoral

Inicialmente no dia 0 foi mensurado a resposta basal ao calor, e em seguida, os animais foram alocados em dois grupos distintos, a saber: grupo falso-operado e grupo incisão. A latência de resposta ao estímulo térmico de animais machos e fêmeas foram avaliados nos dias 1, 3, 5 e 7 após incisão cirúrgica em mucosa oral direita, no intuito de determinar o decurso temporal da hiperalgesia térmica ao calor. Foram realizadas duas medidas consecutivas em cada dia e a média determinou a resposta para latência ao estímulo térmico. Finalizado o experimento os animais foram eutanasiados (ESQUEMA 4).

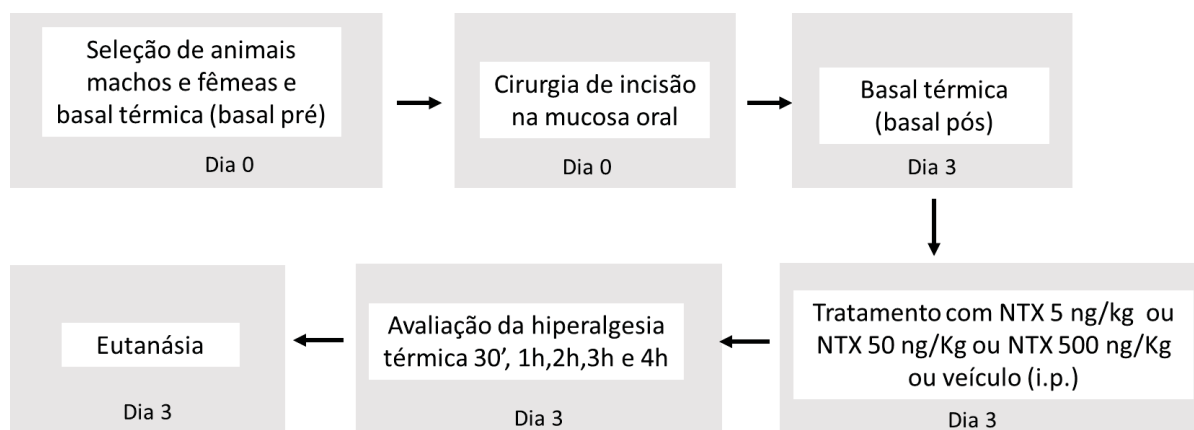


ESQUEMA 4. Linha do tempo referente ao experimento de hiperálgia térmica ao calor em animais fêmeas (n=6 /grupo) e machos (n=10/grupo) no modelo de dor pós-operatória orofacial.

### Experimento 2: Avaliação do efeito antinociceptivo da NTX sistêmica no modelo de dor pós-operatória orofacial

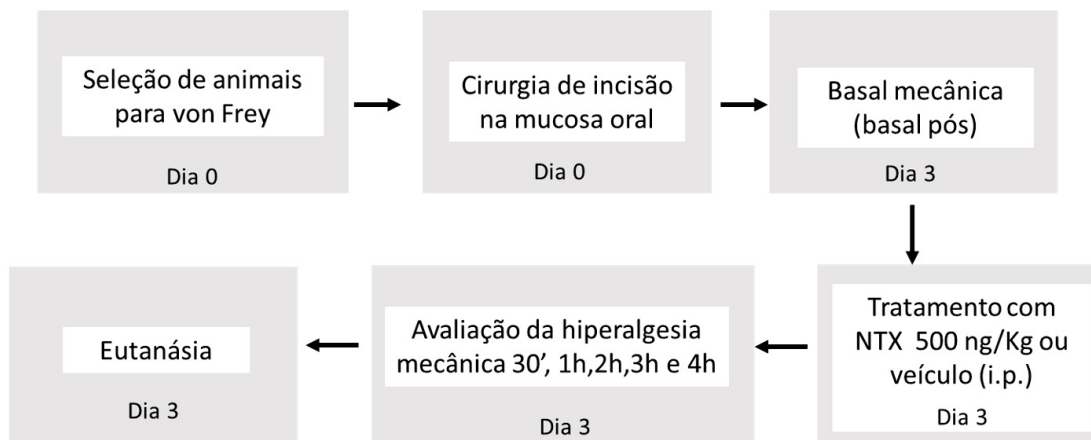
No intuito de avaliar o efeito da NTX sistêmica frente à hiperálgia ao calor, foram selecionados de maneira aleatória animais fêmeas alocadas em 5 grupos distintos, a saber: 1) falso-operado / veículo; 2) incisão / veículo; 3) incisão / NTX 5 ng/Kg ; 4) incisão / NTX 50 ng/Kg e 5) incisão / NTX 500 ng/Kg . A resposta basal dos animais ao estímulo térmico foi registrada previamente à cirurgia de incisão da mucosa (basal pré). Após procedimento cirúrgico (descrito no ítem 3.2.1) e no 3º dia, foi avaliada a resposta basal térmica, previamente ao tratamento sistêmico com NTX.

Após tratamento sistêmico foi avaliada a hiperálgia ao calor em intervalos de 30 minutos, e de 1 hora até 4 horas. Findado o experimento os animais foram eutanasiados (ESQUEMA 5). O mesmo protocolo foi realizado em ratos machos que foram tratados com veículo ou NTX nas doses de 50 e 500 ng/kg.



ESQUEMA 5. Linha do tempo referente ao experimento de avaliação do efeito antinociceptivo da NTX sistêmica na hiperalgisia térmica induzida por incisão em ratos fêmeas (n=6 /grupo) e machos (n=6 /grupo).

No dia 3 após incisão de mucosa oral, os ratos machos foram tratados com NTX 500 ng/Kg (i.p.) ou veículo. A avaliação da hiperalgisia mecânica foi realizada no intervalo de 30 minutos, e em intervalos de 1 hora até a 4ª hora. Findado o experimento os animais foram eutanasiados (ESQUEMA 6).

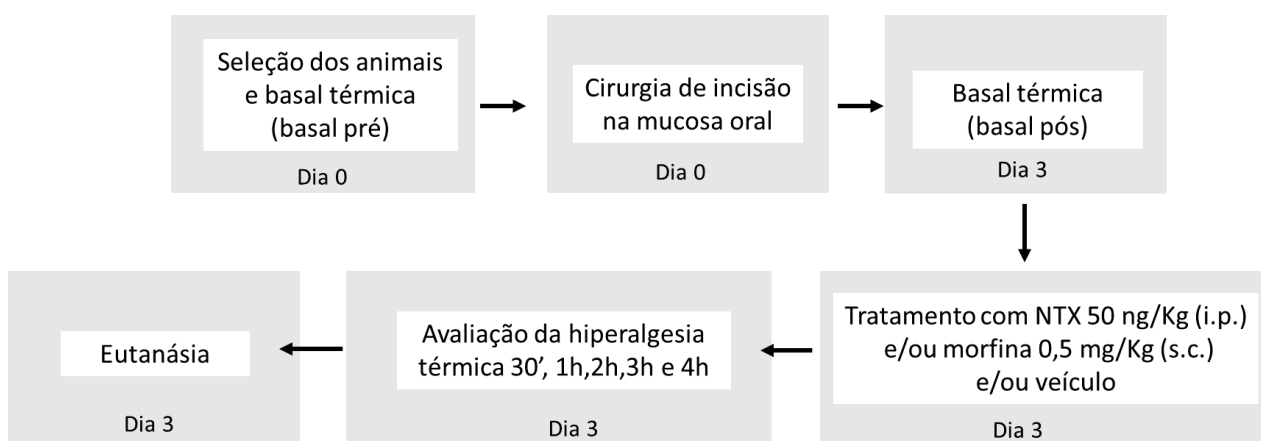


ESQUEMA 6. Linha do tempo referente ao experimento de avaliação do efeito antinociceptivo da NTX sistêmica na hiperalgisia mecânica induzida por incisão da mucosa em ratos machos (n=6 /grupo).

### Experimento 3: Avaliação do efeito da associação da NTX com morfina no modelo de dor pós-operatória orofacial

No dia 3 pós-incisão, foi avaliada a resposta basal ao estímulo térmico previamente ao tratamento farmacológico (basal pós). Em seguida, ratos machos

foram tratados com NTX 50 ng/Kg (i.p.), morfina 0,5 mg/kg (s.c) ou a combinação de ambas as drogas. Os grupos controle foram tratados com os veículos correspondentes. A avaliação da hiperalgesia térmica foi realizada no intervalo de 30 minutos, e em intervalos de 1 hora até a 4ª hora. Finalizado o experimento os animais foram eutanasiados (ESQUEMA 7).



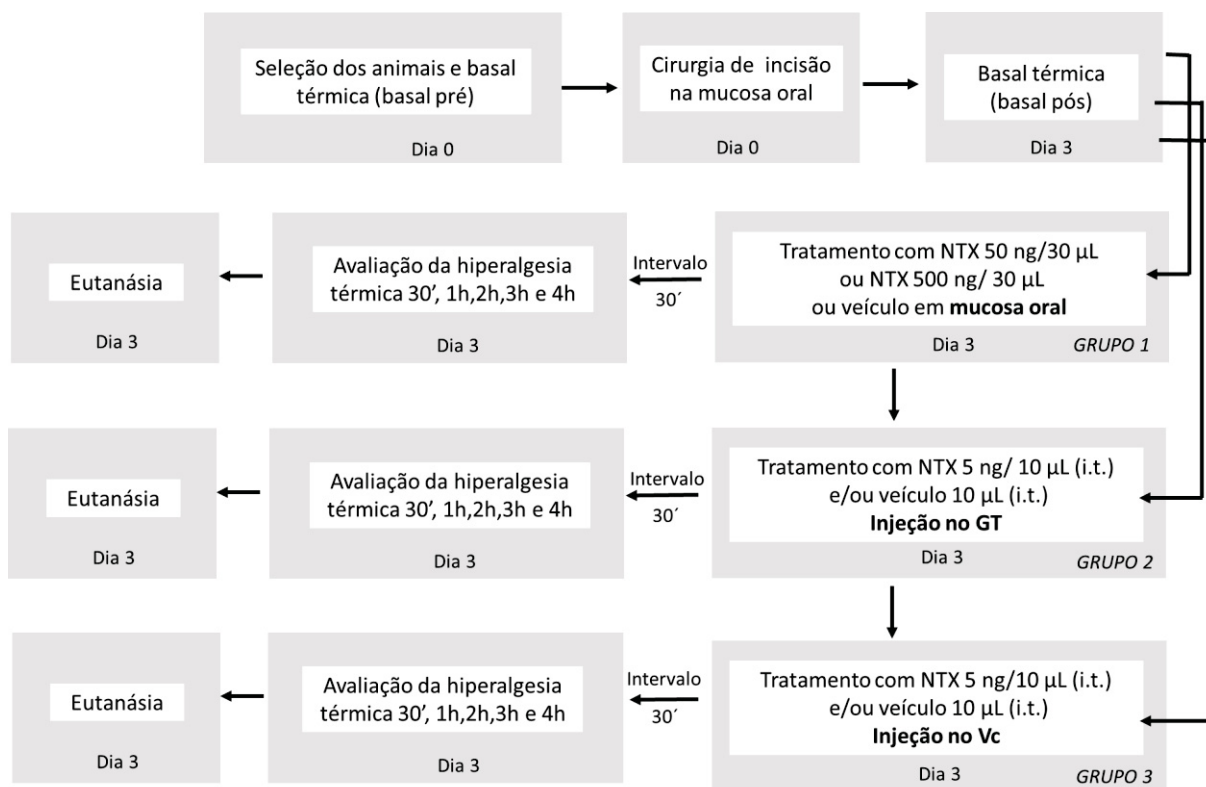
ESQUEMA 7. Linha do tempo referente ao experimento de avaliação do efeito antinociceptivo da NTX associado à morfina no modelo de dor pós-operatória orofacial (n=6 /grupo).

**Experimento 4:** Avaliação do efeito antinociceptivo da NTX administrada na mucosa intraoral, GT ou Vc no modelo de dor pós-operatória orofacial.

No dia 3 pós-operatório foi registrado a resposta basal térmica previamente ao tratamento farmacológico (basal pós). Sequencialmente os animais foram tratados com NTX 50 ng/30 µL ou NTX 500 ng/30 µL e grupo controle tratado com veículo correspondente, aplicados diretamente em região de mucosa intraoral. Após 30 minutos do tratamento farmacológico foi avaliada a hiperalgesia térmica em intervalos de 30 minutos, 1 hora até a 4ª hora. Finalizado o experimento os animais foram eutanasiados (Grupo 1).

No dia 3 após procedimento cirúrgico foi avaliado o limiar de resposta basal térmica previamente ao tratamento farmacológico (basal pós). Em continuidade, os animais foram tratados com NTX 5 ng/10 µL (i.t.) ou veículo correspondente 10 µL (i.t.) injetados no GT e Vc. Após 30 minutos do tratamento farmacológico foi avaliada a hiperalgesia térmica no intervalo de 30 minutos, e em intervalos de 1 hora até a 4ª

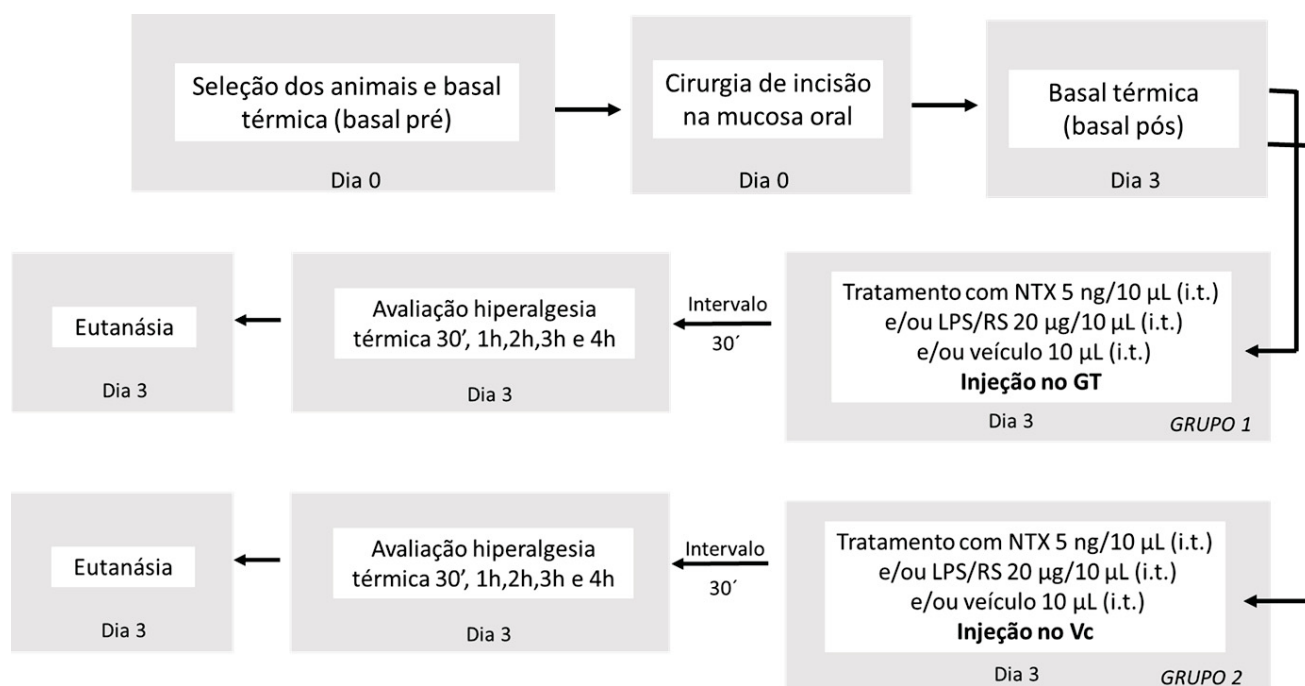
hora. Após conclusão dos experimentos os animais foram eutanasiados (Grupos 2 e 3), conforme apresentado no ESQUEMA 08.



ESQUEMA 8. Linha do tempo referente ao experimento de avaliação do efeito antinociceptivo da NTX aplicados localmente em mucosa intraoral e centralmente no GT e Vc no modelo de dor pós-operatória orofacial (n=6 /grupo).

**Experimento 5:** Avaliação do efeito antinociceptivo da NTX após bloqueio dos receptores TLR4 no GT e Vc em modelo de dor pós-operatória orofacial

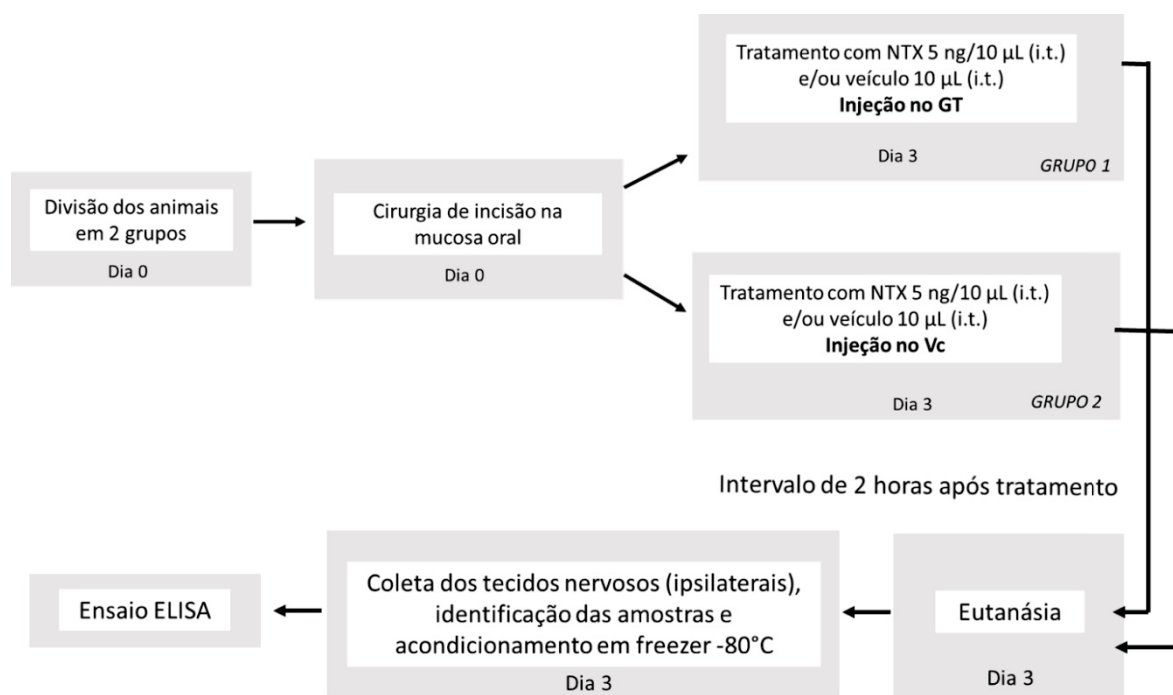
No 3º dia do pós-operatório, previamente ao tratamento farmacológico, foi avaliado o limiar de resposta basal térmica (basal pós). Em continuidade, os animais foram tratados com NTX 5 ng/10 µL (i.t.) e/ou LPS/RS 20 µg/10 µL (i.t.) e/ou veículo correspondente 10 µL (i.t.) diretamente no GT ou Vc, com intervalo de 30 minutos entre cada aplicação nestas estruturas. Após tratamento farmacológico foi realizada a avaliação da hiperálgia térmica em intervalos de 30 minutos, e de 1 hora até 4 horas. Concluídos experimentos os ratos foram eutanasiados (ESQUEMA 09).



ESQUEMA 09. Linha do tempo referente a avaliação do efeito antinociceptivo da NTX após bloqueio dos receptores TLR4 pelo LPS/RS aplicados diretamente no GT e Vc no modelo de dor pós-operatória orofacial (n=6 /grupo).

**Experimento 6:** Avaliação da influência da NTX nos níveis de citocinas pró-inflamatórias no GT e Vc no modelo de dor pós-operatória orofacial

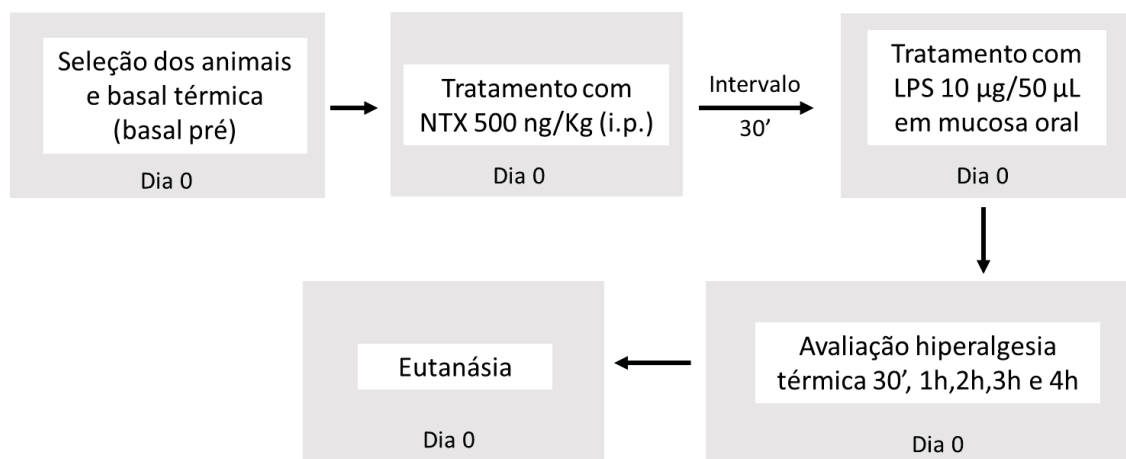
No 3º dia pós-cirúrgico, os ratos receberam tratamento com NTX 5 ng/10 µL e/ou veículo 10 µL aplicados no GT e Vc, sendo eutanasiados após 2 horas do tratamento farmacológico. Imediatamente as estruturas nervosas ipsilaterais ao tratamento foram coletadas devidamente identificadas e acondicionadas em freezer. Sequencialmente as amostras foram analisadas para quantificação dos mediadores pró-inflamatórios (IL1β, IL-6, TNF-α e SP) através do ensaio imunoenzimático de ELISA (ESQUEMA 10).



ESQUEMA 10. Linha do tempo referente ao experimento de quantificação de citocinas pró-inflamatórias presentes no GT e Vc no efeito da NTX aplicado diretamente nestas estruturas nervosas no modelo de dor pós-operatória orofacial (n=5-8/grupo).

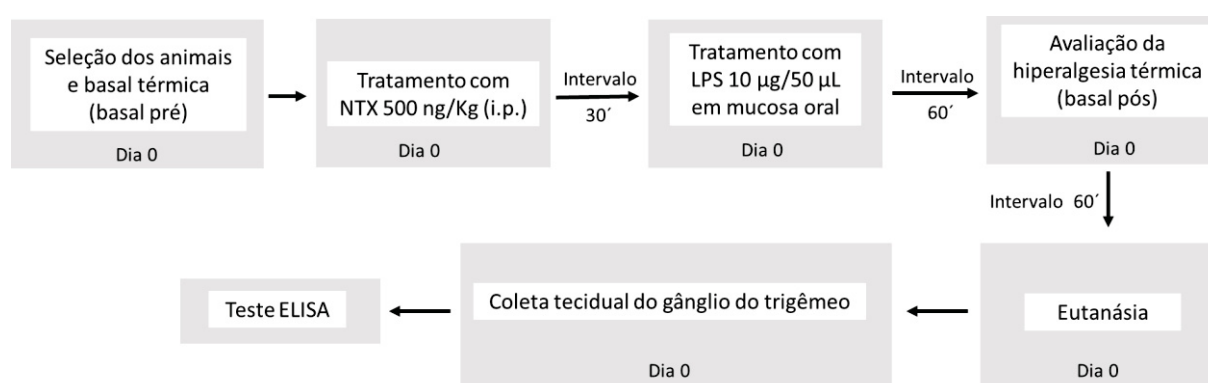
**Experimento 7:** Avaliação do efeito antinociceptivo da NTX na hiperalgesia orofacial e níveis de citocinas no GT induzidos por LPS

Após avaliação da resposta basal ao estímulo térmico os ratos foram tratados com NTX 500 ng/Kg (i.p.) ou veículo correspondente (i.p.) e 30 minutos depois foram tratados com LPS 10µg/50µL na mucosa intraoral. Após os tratamentos, foi avaliada a hiperalgesia térmica em intervalos de 30 minutos, e de 1 hora até 4 horas. Finalizado experimento os animais foram eutanasiados (ESQUEMA 11).



ESQUEMA 11. Linha do tempo referente ao experimento de avaliação do efeito antinociceptivo da NTX na hiperalgisia orofacial induzida pelo agonista de TLR4 (LPS) (n=10 /grupo).

Um grupo independente de animais foi tratado com NTX 500ng/Kg (i.p.) ou veículo (i.p.) por via sistêmica e após 30 minutos foi tratado com LPS 10 µg/50 µL ou veículo na mucosa intraoral. Após 1 hora dos tratamentos, foi avaliada a hiperalgisia térmica na face (basal pós). Os animais foram eutanasiados 2 horas após os tratamentos e o GT ipsilateral foi removido e acondicionado em freezer. Posteriormente as amostras foram analisadas através de ensaio imunoenzimático de ELISA para quantificação dos mediadores pró-inflamatórios TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e SP (ESQUEMA 12).



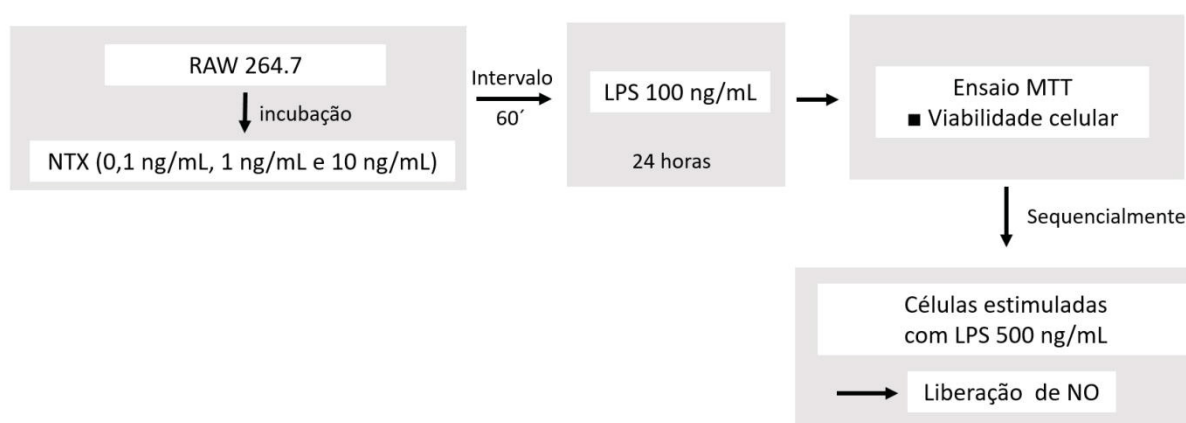
ESQUEMA 12. Linha do tempo referente ao experimento de quantificação de citocinas pró-inflamatórias presentes no GT, após ativação de receptores TLR4 pelo LPS em mucosa oral no efeito da NTX aplicado diretamente nesta estrutura nervosa (n=10 /grupo).



**Experimento 8:** Avaliação da influência da NTX na viabilidade celular, liberação de NO e liberação de mediadores pró-inflamatórios em macrófagos estimulados com LPS

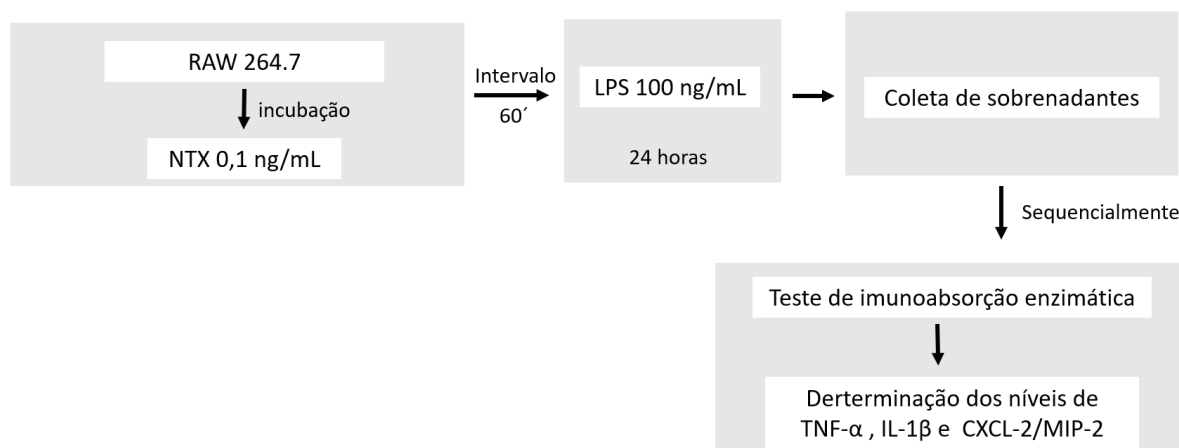
Na análise da viabilidade celular, macrófagos da linhagem RAW 264.7 foram incubados com diferentes concentrações de NTX (0,1 ng/mL, 1 ng/mL e 10 ng/mL), e após 1 hora de incubação, foi adicionado o LPS na concentração de 100 ng/mL, cujas placas foram incubadas por mais 24 h. Finalizado o período de incubação foi verificado a citotoxicidade através de ensaio de redução MTT, cuja viabilidade celular foi expressa em porcentagem em relação ao controle.

Sequencialmente estas células foram estimuladas com LPS 500 ng/mL a fim de determinar a liberação de NO, bem como a influência da NTX nesse parâmetro (ESQUEMA 13).



ESQUEMA 13. Linha do tempo referente ao experimento *in vitro* de análise da viabilidade celular e liberação de NO em macrófagos estimulados por LPS (n=5-8 /grupo).

Para avaliação da expressão de mediadores pró-inflamatórios, foi utilizado o ensaio imunoenzimático de ELISA, no qual células RAW 264.7 foram tratadas com NTX 0,1 ng/mL, e após 1 hora foi adicionado 100 ng/mL de LPS. Após período de incubação os sobrenadantes foram coletados e os níveis das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , e da quimiocina CXCL-2/MIP-2 foram determinados através do teste de imunoabsorção enzimática (ESQUEMA 14).



ESQUEMA 14. Linha do tempo referente à análise *in vitro* de quantificação dos níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e CXCL-2/MIP-2 em células estimuladas por LPS (n=5-8 /grupo).

### 3.2.10 Análise estatística

As diferenças entre os grupos na avaliação da hiperalgesia térmica e mecânica foram analisadas por análise de variância (ANOVA) de duas vias com medidas repetidas seguida pelo teste *post hoc* Bonferroni. Os resultados foram reportados como média  $\pm$  Erro Padrão da Média (EPM). Foi empregada ANOVA de uma via seguida do teste *post hoc* de Bonferroni na análise das dosagens de citocinas no GT e Vc, viabilidade celular e liberação de NO em macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS. Esses resultados foram reportados como média  $\pm$  Desvio Padrão da Média (DPM). As diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significantes quando o valor foi  $P \leq 0,05$ . GraphPad Prism versão 8 para Windows foi usado para análise estatística dos dados (GraphPad Software, San Diego, CA).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 DECURSO TEMPORAL DA HIPERALGESIA TÉRMICA EM RATOS FÊMEAS E MACHOS APÓS INCISÃO DA MUCOSA ORAL

Ratos fêmeas foram avaliados quanto à hiperalgesia térmica no 1º, 3º, 5º e 7º dias após procedimento cirúrgico e foi evidenciado que os animais operados apresentaram uma diminuição de latência para resposta ao estímulo no 3º dia até 5º dia ( $P < 0,05$ ) quando em comparação ao grupo falso-operado (FIGURA 1A).

Seguindo o mesmo protocolo experimental foram avaliados os animais machos, e foi demonstrado que os animais operados apresentaram diminuição da latência para resposta ao estímulo térmico do 1º dia até o 5º dia ( $P < 0,05$ ) quando comparados aos animais do grupo falso-operado (FIGURA 1B).

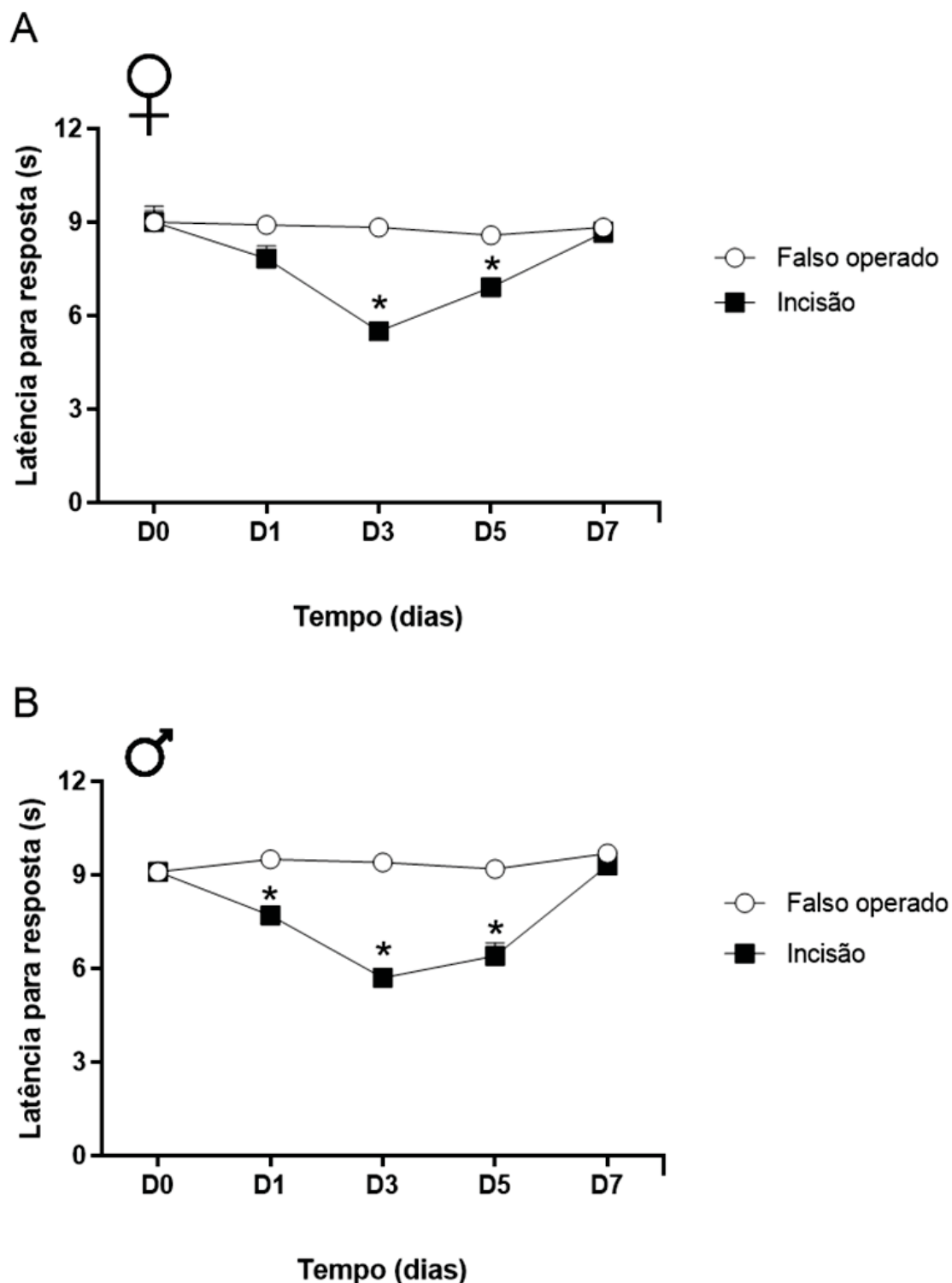


FIGURA 1: AVALIAÇÃO DA HIPERALGESIA TÉRMICA EM RATOS FÊMEAS E MACHOS APÓS INCISÃO INTRAORAL. Avaliação da hiperálgia térmica na face antes (D0) e nos dias 1, 3, 5 e 7 após a incisão da mucosa oral em ratos fêmeas (A) e machos (B). Os valores representam média + E.P.M, (n=6 /grupo fêmeas; n=10 / grupo machos). ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguida do teste de *post hoc* de Bonferroni. \*P<0,05 em relação ao grupo Falso-operado.

#### 4.2 AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA NTX SISTÊMICA NO MODELO DE DOR PÓS-OPERATÓRIA OROFACIAL

O tratamento sistêmico com NTX 500 ng/kg (i.p.) em ratos fêmeas realizado no dia 3 após incisão intraoral, foi capaz de reduzir a hiperalgesia térmica nos 30 minutos iniciais até a 1ª hora após a administração ( $P < 0,05$ ) em relação ao grupo controle. Contudo, as doses de 5 ng/Kg e 50 ng/Kg não foram capazes de promover efeito antinociceptivo significativo em nenhum dos tempos avaliados ( $P > 0,9999$ , FIGURA 2A).

O tratamento com NTX 500 ng/kg em ratos machos causou redução da hiperalgesia térmica desde os 30 minutos até a 3ª hora após sua administração ( $P < 0,05$ ) em relação ao grupo incisão tratado com veículo. Não houve redução do limiar da latência para resposta ao estímulo térmico na dose de 50 ng/kg em nenhum dos tempos avaliados ( $P > 0,9999$ , FIGURA 2B). Importante salientar que o tratamento sistêmico na dose de 500 ng/kg não promoveu alteração do limiar de resposta no grupo falso-operado ( $P > 0,9999$ ).

Na avaliação da hiperalgesia mecânica, foi observado que o tratamento sistêmico com NTX 500 ng/Kg (i.p.) foi capaz de aumentar o limiar mecânico desde 30 minutos até a 3ª hora após a administração ( $P < 0,05$ ), quando comparado ao grupo incisão-veículo (FIGURA 2C).

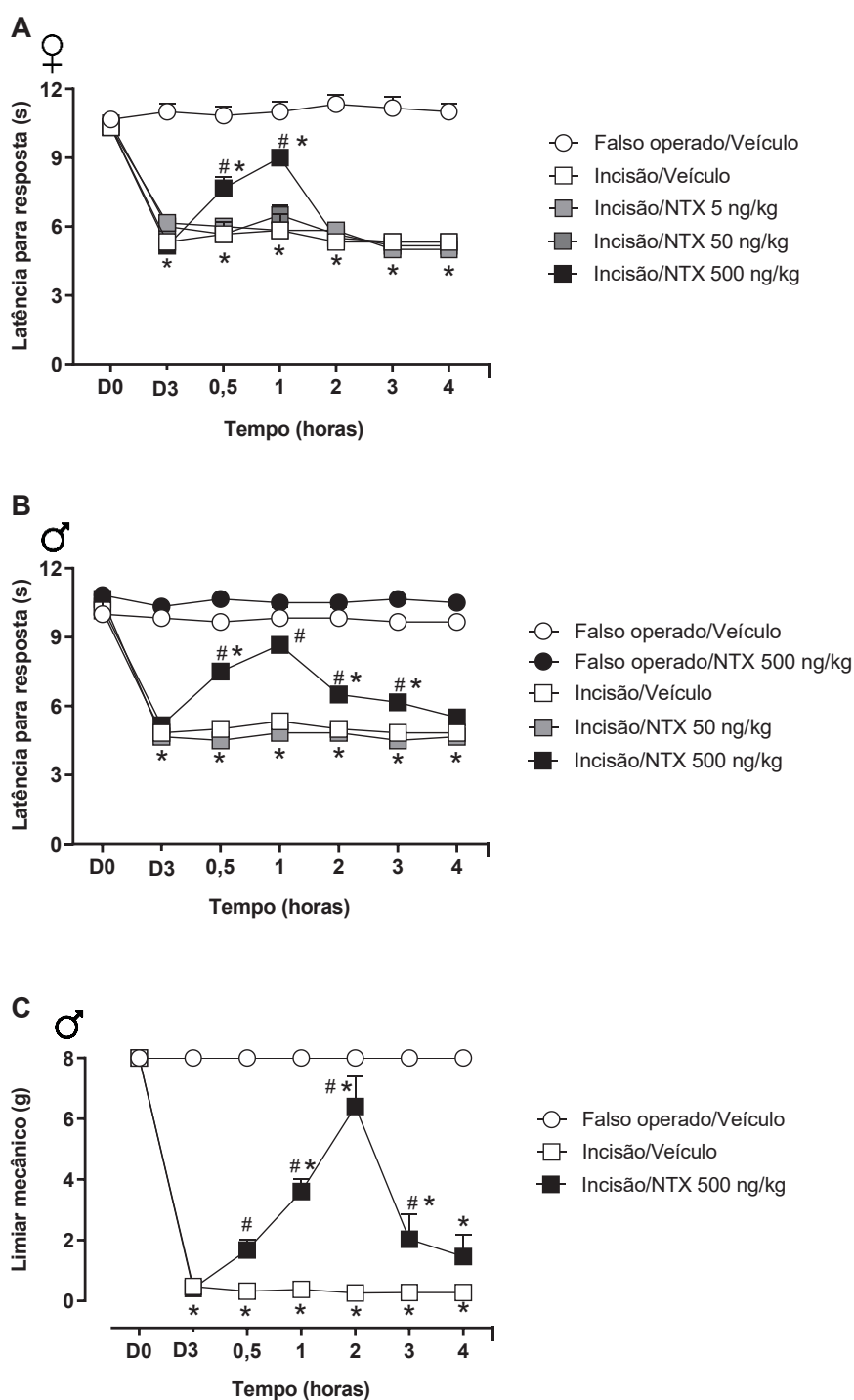


FIGURA 2: EFEITO DO TRATAMENTO SISTÊMICO COM NTX NA HIPERALGESIA TÉRMICA E MECÂNICA INDUZIDA POR INCISÃO INTRAORAL EM RATOS FÊMEAS E MACHOS. A latência para resposta ao calor e o limiar mecânico foram avaliados antes do procedimento cirúrgico (D0) e no 3º dia pós-cirúrgico (D3). A) Fêmeas foram tratadas com NTX ou veículo no D3, e o limiar térmico foi avaliado em intervalos de 30 minutos, e entre 1 até 4 horas. B) Ratos machos foram tratados com NTX ou veículo no D3, e avaliados em intervalos de 30 minutos, e entre 1 até 4 horas. C) Ratos machos foram tratados com NTX ou veículo no D3 e avaliados quanto à hiperalgisia mecânica em intervalos de 30 minutos, e entre 1 até 4 horas. Os valores representam média + E.P.M. (n=6/grupo). ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguida do teste de *post hoc* de Bonferroni. \*P<0,05 em relação ao grupo Falso-operado / Veículo e #P<0,05 em relação ao grupo Incisão / Veículo.

#### 4.3 EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DA NTX COM MORFINA EM MODELO DE DOR PÓS-OPERATÓRIA OROFACIAL

A associação da NTX 50 ng/Kg (i.p.) e morfina 0,5 mg/Kg (s.c.), realizada no 3º dia após incisão intraoral, resultou em efeito antinociceptivo, promovendo um aumento da latência resposta ao estímulo térmico, entre 30 minutos até a 2ª hora ( $P < 0,05$ ). O tratamento isolado com NTX 50 ng/Kg (i.p.) ou morfina 0,5 mg/kg (s.c.) não foi capaz de promover efeito antinociceptivo ( $P > 0,9999$ , FIGURA 3).

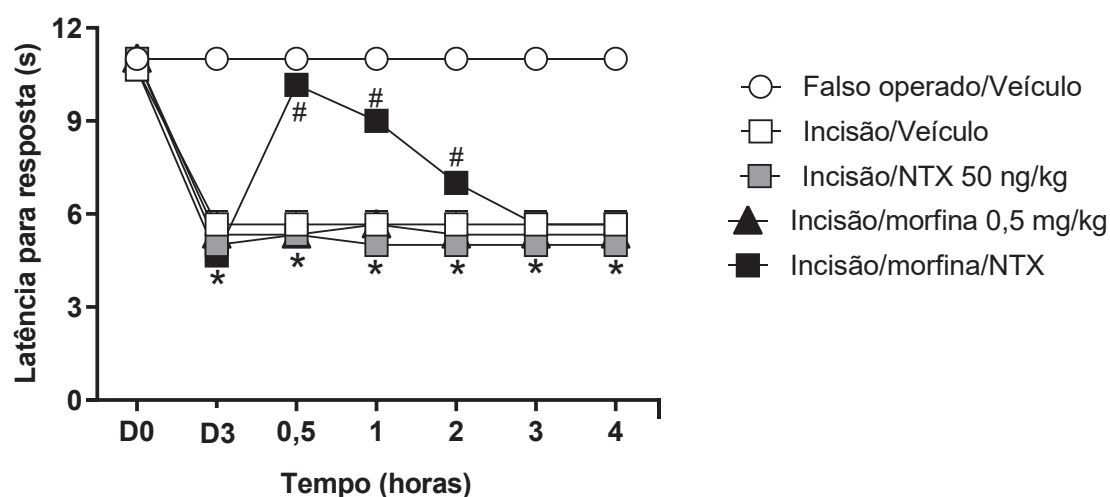


FIGURA 3: EFEITO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE MORFINA E NTX NA HIPERALGESIA TÉRMICA INDUZIDA POR INCISÃO INTRAORAL. O limiar térmico foi avaliado antes do procedimento cirúrgico (D0) e no 3º dia pós-cirúrgico (D3). Os animais foram tratados no D3 com veículo, NTX (50 ng/Kg), morfina (0,5 mg/Kg) ou a associação dos fármacos. A hiperalgesia térmica foi avaliada em intervalos de 30 minutos, e de 1 hora até 4 horas. Os valores representam média + E.P.M. (n=6 /grupo). ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguida de teste de *post hoc* de Bonferroni. \* $P < 0,05$  em relação ao grupo Falso-operado / Veículo e # $P < 0,05$  em relação ao grupo Incisão / Veículo.

#### 4.4 EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA NTX ADMINISTRADA NA MUCOSA, NO GT E NO Vc NO MODELO DE DOR PÓS-OPERATÓRIA OROFACIAL

O tratamento com NTX (50 ng/30  $\mu$ L ou 500 ng/30  $\mu$ L) diretamente na mucosa intraoral, realizado no 3º dia após incisão, não modificou a hiperalgesia térmica em nenhum intervalo de tempo avaliado ( $P > 0,9999$ , FIGURA 4A).

Por outro lado, o tratamento com NTX 5 ng/10  $\mu$ L no GT realizado no dia 3 após a incisão, promoveu um aumento da latência para resposta ao estímulo térmico desde os 30 minutos iniciais, estendendo-se até 3ª hora ( $P < 0,05$ ), quando comparado ao grupo incisão tratado com veículo. Já os animais que receberam a menor dose 0,5 ng/10  $\mu$ L apresentaram aumento da latência para resposta somente até a 1ª hora, quando comparados ao grupo controle ( $P < 0,05$ ). Os animais do grupo falso-operado que receberam NTX 5 ng/10  $\mu$ L no GT não apresentaram alteração do limiar de resposta em nenhum dos tempos avaliados ( $P > 0,9999$ , FIGURA 4B).

Ademais, o tratamento com a NTX 5 ng/10  $\mu$ L no Vc no 3º dia após incisão intraoral, foi capaz de promover aumento da latência para resposta ao estímulo térmico, que se iniciou 30 minutos após tratamento e estendeu-se até a 3ª hora ( $P < 0,05$ ). Contudo, o tratamento com a menor dose 0,5 ng/10  $\mu$ L foi capaz de promover efeito antinociceptivo somente até a 2ª hora ( $P < 0,05$ ), quando comparado ao grupo controle. Os animais do grupo falso-operado que receberam NTX 5 ng/10  $\mu$ L no Vc não apresentaram alteração do limiar de resposta em nenhum dos tempos avaliados ( $P > 0,9999$ , FIGURA 4C).



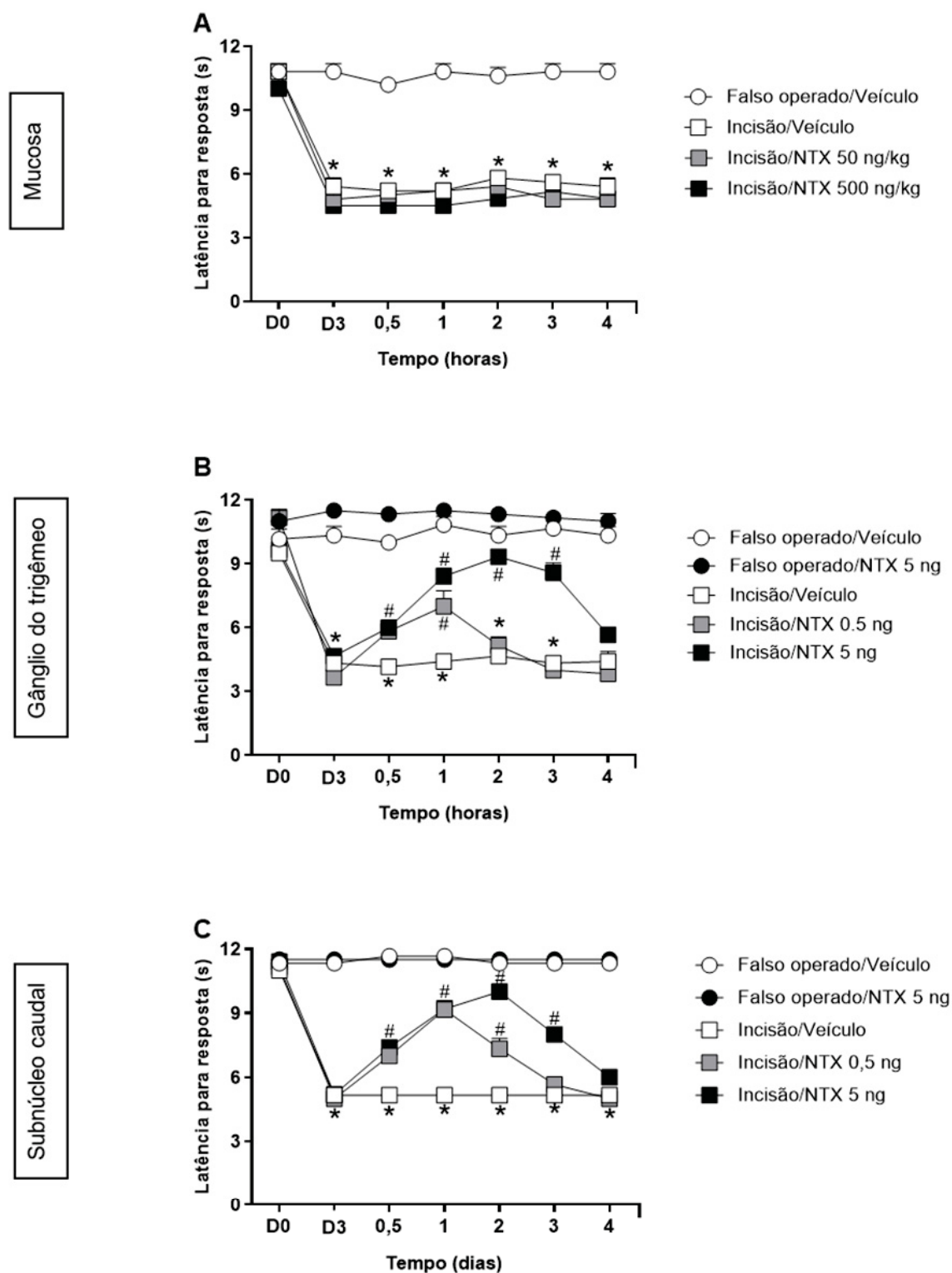


FIGURA 4. EFEITO DO TRATAMENTO COM NTX NA MUCOSA, GT E Vc NA HIPERALGESIA TÉRMICA INDUZIDA POR INCISÃO INTRAORAL. O limiar térmico foi avaliado antes do procedimento cirúrgico (D0) e no 3º dia pós-cirúrgico (D3). A) Os animais foram tratados no D3 com NTX ou veículo que foram administrados na mucosa intraoral (A), no GT (B) e no Vc (C). A hiperálgia térmica foi avaliada em intervalos de 30 minutos, e entre 1 hora até 4 horas. Os valores representam média + E.P.M. (n=6 /grupo). ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguida do teste de *post hoc* de Bonferroni. \*P<0,05 em relação ao grupo Falso-operado / Veículo e #P<0,05 em relação ao grupo Incisão / Veículo.

#### 4.5 EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA NTX APÓS BLOQUEIO DOS RECEPTORES TLR4 NO GT E Vc EM MODELO DE DOR PÓS-OPERATÓRIA OROFACIAL

A incisão promoveu nítida resposta hiperalgésica nos animais e a injeção de NTX 5 ng/10 uL no GT foi capaz de promover aumento da latência para resposta ao estímulo térmico, que se estendeu até a 3ª hora ( $P < 0.001$ , FIGURA 5A) quando comparado ao grupo controle. Contudo, o bloqueio dos receptores TLR4 através do LPS-RS 20 µg/10 µL diretamente no GT não alterou a latência para resposta em nenhum dos tempos avaliados ( $P > 0.9999$ , FIGURA 5A). Ademais, o tratamento prévio com LPS-RS no GT bloqueou o efeito analgésico da NTX injetada na mesma estrutura anatômica ( $P < 0.0001$ , FIGURA 5A).

O tratamento dos animais operados com NTX 5 ng/10 uL injetado no Vc foi capaz de promover aumento da latência para resposta ao estímulo térmico, que se estendeu até a 3ª hora ( $P < 0.001$ , FIGURA 5B). Contudo, o tratamento isolado com LPS-RS 20 µg/10 µL (i.t.) não foi capaz de alterar a latência para resposta em nenhum dos tempos avaliados ( $P > 0.9999$ , FIGURA 5B). De maneira semelhante, o tratamento prévio com LPS-RS também bloqueou o efeito antinociceptivo da NTX quando aplicado na mesma estrutura anatômica ( $P < 0.0001$ , FIGURA 5B).

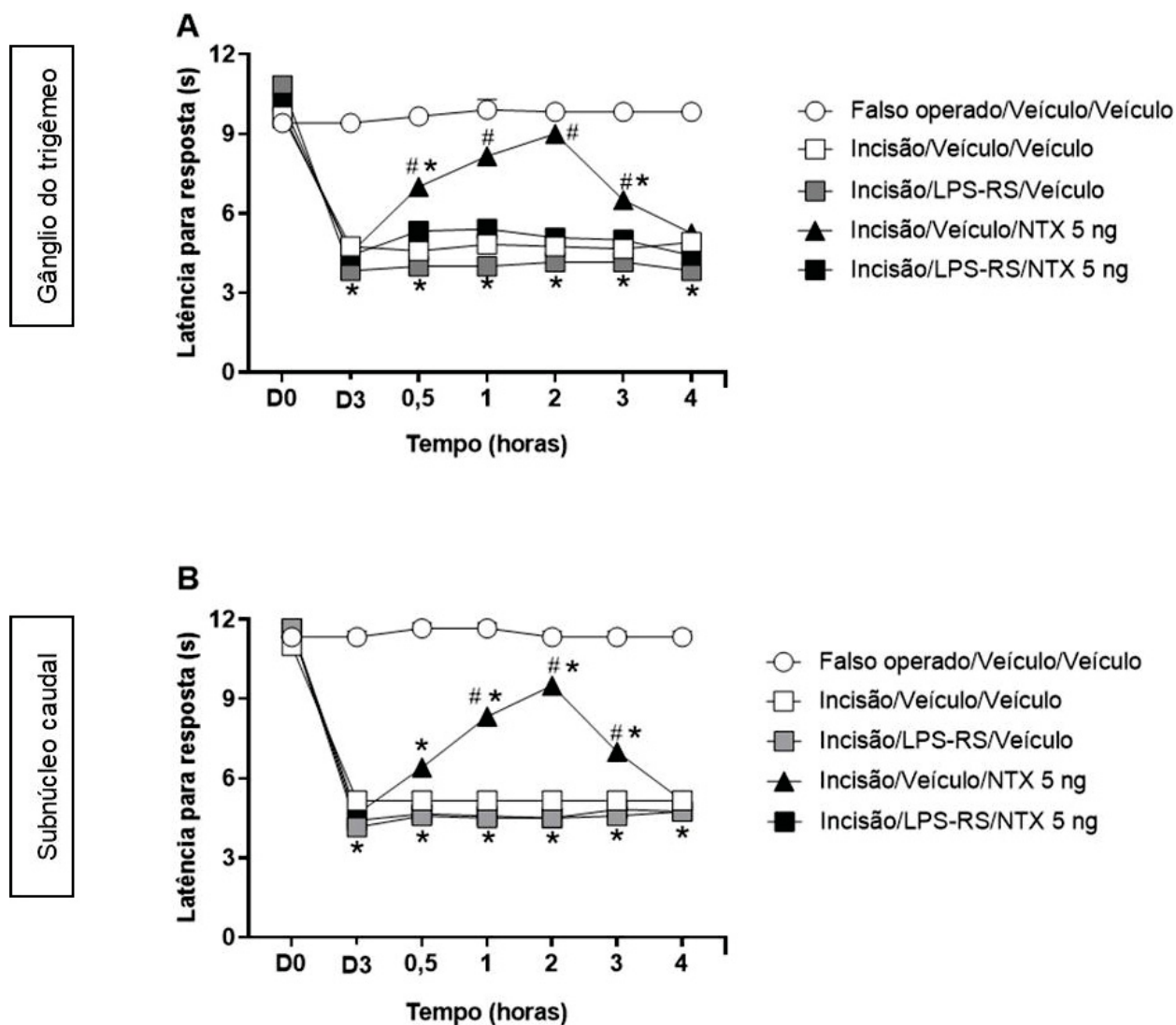


FIGURA 5: INFLUÊNCIA DO BLOQUEIO DOS RECEPTORES TLR4 NO EFEITO DA NTX NA HIPERALGESIA TÉRMICA INDUZIDA POR INCISÃO INTRAORAL. O limiar térmico foi avaliado antes do procedimento cirúrgico (D0) e no 3º dia pós-cirúrgico (D3). Animais foram tratados no D3 com LPS/RS seguido de NTX ou os veículos correspondentes diretamente no GT (A) ou Vc (B). A hiperalgisia térmica foi avaliada em intervalos de 30 minutos, e entre 1 até 4 horas após os tratamentos. Os valores representam média + E.P.M. (n=6 /grupo), dados analisados utilizando ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguida do teste de *post hoc* de Bonferroni. \*P<0,05 em relação ao grupo Falso-operado / Veículo / Veículo e #P<0,05 em relação ao grupo Incisão / Veículo / Veículo.

#### 4.6 INFLUÊNCIA DA NTX NOS NÍVEIS DE MEDIADORES PRÓ-INFLAMATÓRIAS NO GT NO MODELO DE DOR PÓS-OPERATÓRIA OROFACIAL

Foi avaliada a influência da NTX 5 ng/10  $\mu$ l (i.t.) nos níveis de mediadores pró-inflamatórias no GT. Ratos machos operados não mostraram aumento significativo de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e SP no GT ipsilateral à incisão, em relação ao grupo falso-operado. O tratamento com NTX não alterou os níveis de mediadores no GT ( $P > 0,05$ , FIGURA 6).

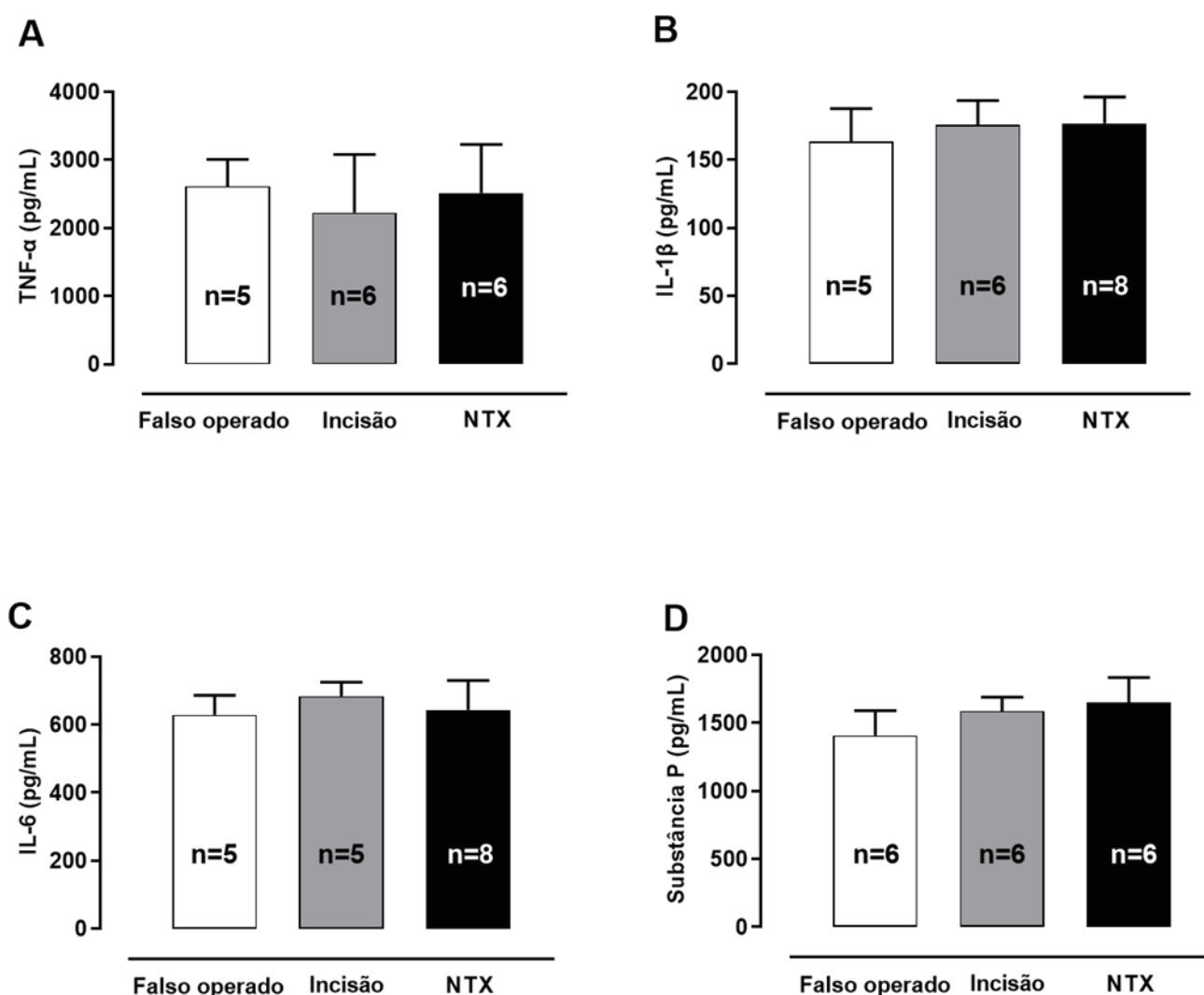


FIGURA 6: AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA NTX NOS NÍVEIS DE MEDIADORES PRÓ-INFLAMATÓRIOS NO GT APÓS INCISÃO INTRAORAL. Os animais foram operados no dia 0 e no 3º dia pós-cirúrgico receberam tratamento com NTX 5ng/10 $\mu$ l ou veículo injetados no GT. Após 2 horas do tratamento os animais foram eutanasiados e o GT ipsilateral foi coletado para dosagem dos mediadores pró-inflamatórios através de ELISA. Os valores representam média + E.P.M., dados analisados utilizando ANOVA de uma via para medidas repetidas seguida do teste de *post hoc* de Bonferroni.

#### 4.7 INFLUÊNCIA DA NTX NA HIPERALGESIA OROFACIAL E NOS NÍVEIS DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS NO GT INDUZIDOS POR LPS

O tratamento com LPS 10 µg/50 µl realizado diretamente na mucosa oral dos animais machos resultou num quadro hiperalgésico, com diminuição de latência para resposta ao estímulo térmico desde os 30 minutos iniciais até a 2<sup>a</sup> hora. O tratamento prévio com NTX 500 ng/kg (i.p.) foi capaz de reverter a hiperalgesia térmica induzida pelo LPS ( $P < 0.0001$ , FIGURA 7A).

A administração de LPS 10 µg/50 µl diretamente em região de mucosa intraoral promoveu aumento dos níveis da IL-1β no GT quando comparado ao grupo controle ( $P < 0,0001$ , FIGURA 7B), enquanto que o tratamento sistêmico com NTX 500 ng/Kg (i.p.) foi capaz de reduzir de maneira significativa os níveis desta citocina ( $P < 0.001$ , FIGURA 7B).

Ademais, foi observado que níveis do TNFα também foram aumentados após injeção do LPS 10 µg/50 µl em mucosa oral ( $P < 0.0001$ , FIGURA 7C), porém a administração sistêmica de NTX 500 ng/kg (i.p.) não causou alteração significativa ( $P = 0,8602$ , FIGURA 7C).

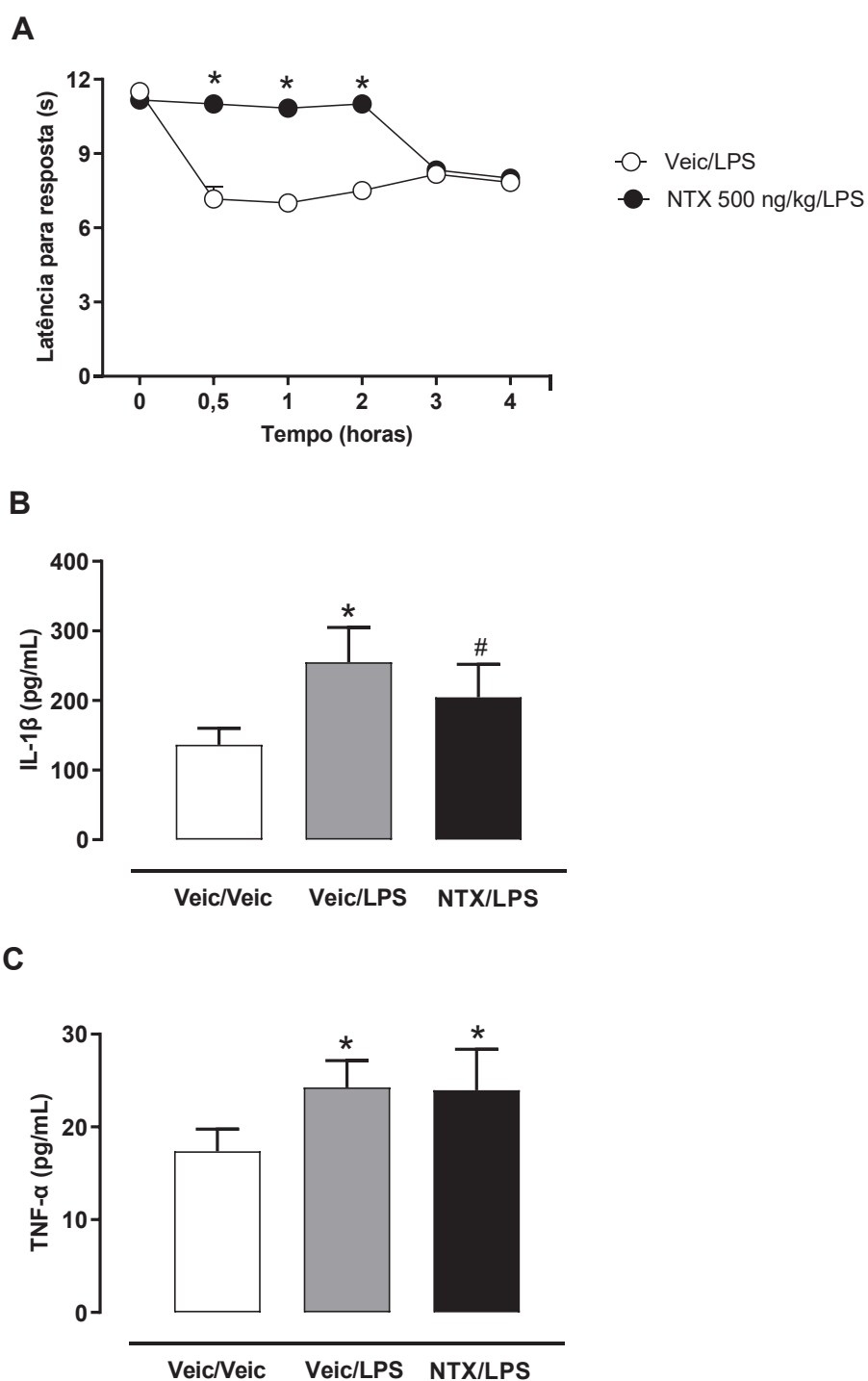


FIGURA 7: EFEITO DO TRATAMENTO SISTÊMICO COM NTX NA HIPERALGESIA TÉRMICA INDUZIDA POR LPS E NÍVEIS DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS NO GT. A) O limiar basal térmico foi avaliado antes do tratamento com NTX ou Veículo. Após 30 minutos o LPS foi injetado na mucosa oral e a hiperalgisia térmica foi mensurada em intervalos de 30 minutos, 1 hora até 4 horas. Grupo independente de animais receberam o mesmo tratamento acima descrito e foram eutanasiados 2 horas após para coleta do GT e posterior análise de quantificação dos níveis de IL1- $\beta$  (B) e TNF $\alpha$  (C) através de ELISA. Os valores representam média + E.P.M. (n=10/grupo). \*P<0,05 quando comparado com o grupo Veículo/veículo e #P<0,05 quando em comparação com o grupo Veículo/LPS.

#### 4.8 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA NTX NA VIABILIDADE CELULAR, LIBERAÇÃO DE NO E LIBERAÇÃO DE MEDIADORES PRÓ-INFLAMATÓRIOS EM MACRÓFAGOS ESTIMULADOS COM LPS

No ensaio de viabilidade celular, tanto o LPS quanto a NTX (10 ng/mL, 1 ng/mL e 0,1 ng/mL) causaram sutil redução no percentual de macrófagos da linhagem RAW 264.7 viáveis ( $P < 0.0001$ , FIGURA 8A). A porcentagem de células viáveis foi 81.5% no grupo LPS, 87.7% no grupo LPS+NTX 0.1 ng/mL, 81.4% no grupo LPS+NTX 1 ng/mL e 73.1% no grupo LPS+NTX 10 ng/mL. A exposição das células ao LPS resultou em aumento significativos da liberação de NO, bem como nos níveis de CXCL-2, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  em comparação ao grupo controle ( $P < 0.001$ , FIGURA 8B-E). Somente a exposição de NTX 0,1 ng/mL foi capaz de reduzir de maneira significativa a liberação de NO ( $P < 0.001$ , FIGURA 8B), quando em comparação ao grupo controle. O tratamento com NTX 0,1 ng/mL promoveu redução significativa da expressão do CXCL-2 ( $P < 0.0001$ , FIGURA 8C) e IL-1 $\beta$  ( $P = 0.0006$ , FIGURA 8E) quando comparados ao grupo LPS. A NTX não alterou os níveis de TNF- $\alpha$  ( $P = 0.5415$ , FIGURA 8D).

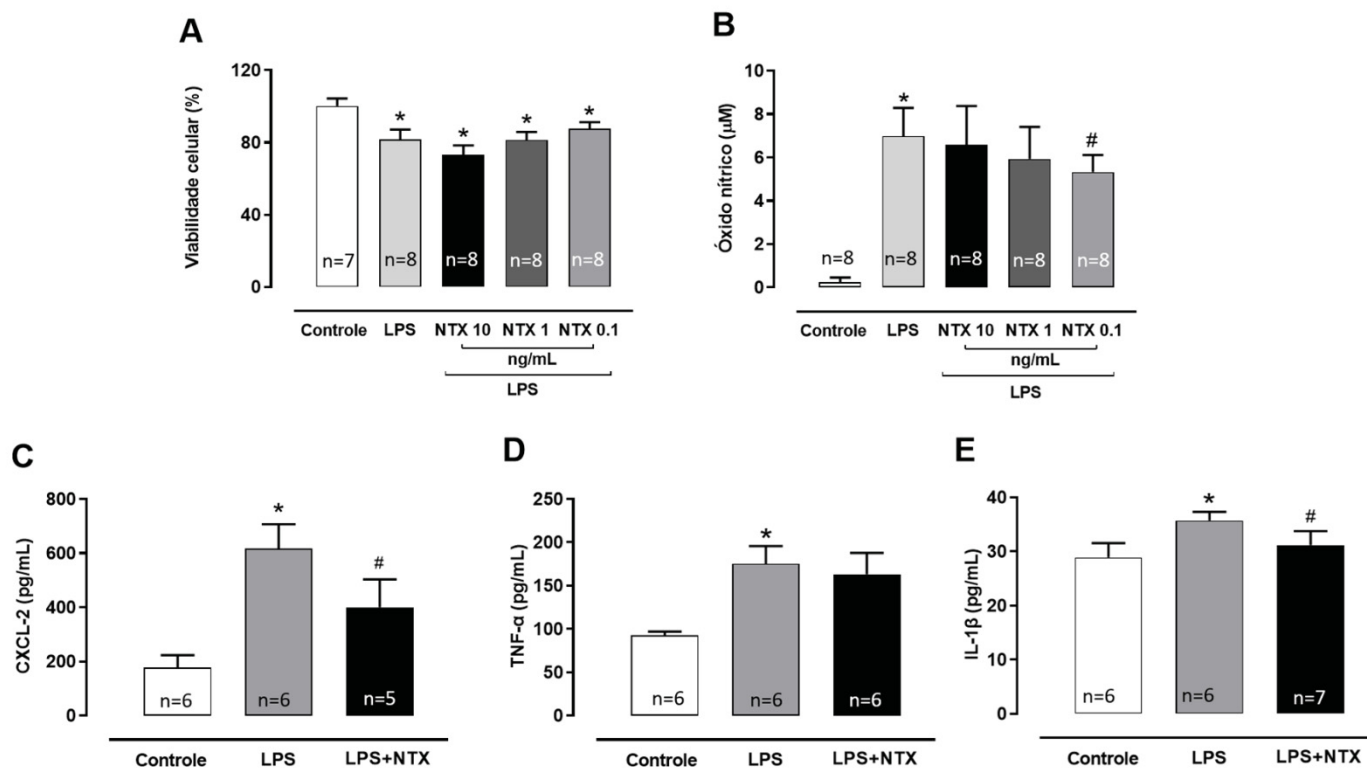


FIGURA 8: INFLUÊNCIA DA NTX NA VIABILIDADE CELULAR, LIBERAÇÃO DE NO E DE MEDIADORES PRÓ-INFLAMATÓRIOS EM MACRÓFAGOS RAW 264.7 ESTIMULADOS POR LPS. A) Viabilidade celular em células RAW 264.7 estimuladas por LPS e tratadas com NTX em diferentes concentrações. B) Liberação de NO após tratamento com NTX em macrófagos estimulados por LPS. C-E) Avaliação da expressão dos mediadores pró-inflamatórios CXCL-2, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  após tratamento com NTX 0,1 ng/mL em macrófagos estimulados por LPS. Os valores representam média + D.P.M. \*  $P < 0,05$  em relação ao controle, #  $P < 0,05$  em relação ao grupo LPS. Dados analisados utilizando ANOVA de uma via seguida do teste *post hoc* de Bonferroni.



## 5 DISCUSSÃO

Este estudo inédito apresenta evidências do potencial antinociceptivo da ULDN em modelo de DPO orofacial em ratos e ao mesmo tempo explora possíveis mecanismos de ação subjacentes a este processo.

O manejo da DPO imediata ao ato cirúrgico, é considerado um desafio aos prescritores, principalmente no que tange às prescrições de opioides, muito utilizadas na DAPO, as quais precisam ser revistas, pois além dos efeitos adversos pertinentes a esta classe farmacológica, existe real risco de adição e/ou abuso, capaz de ceifar vidas (ARGOFF, 2014; POGATZKI-ZAHN *et al.*, 2018; GLARE, 2019), assim, alternativas prescritivas precisam ser levadas em consideração.

O estudo da ULDN no controle da DAPO foi muito instigante e desafiador, pois até presente momento, não há na literatura científica estudos com enfoque na DOF aguda que utilize a NTX para fins analgésicos, ao passo que diversos estudos clínicos abordam, em sua maioria, tratamentos de condições crônicas, em particular de doenças de cunho neuroinflamatório e autoimune, o que torna este assunto relevante, visto a escassez de publicações atuais.

Assim, a presente tese traz evidências científicas sobre o efeito da ULDN através de diversos experimentos *in vivo* no controle analgésico na DAPO orofacial de natureza inflamatória, além de ensaios *in vitro*, revelando-se como promissora alternativa terapêutica nestas condições, além de abrir horizontes para futuros estudos translacionais.

Num primeiro instante tentamos identificar a existência de diferença comportamental entre animais fêmeas e machos através do teste de hiperalgesia térmica ao calor, previamente ao tratamento farmacológico, no modelo de DPO orofacial, afim de caracterizar qual sexo destes animais seriam mais elegíveis/responsivos para continuidade desta pesquisa.

Pouquíssimos são os artigos relevantes que versam sobre a DAPO em mucosa oral, embora diversos trabalhos demonstrem a hipersensibilidade à dor pós- cirúrgica induzida através de variados modelos de lesões traumáticas (ex. incisões teciduais, constrição nervosa) na região orofacial, ou mesmo em outras partes do corpo do animal (URATA *et al.*, 2018; POGATZKI-ZAHN *et al.*, 2018), contudo nenhum estudo abordou a diferença comportamental ao estímulo térmico entre sexos, especificamente no modelo de incisão em mucosa intraoral.

Nesse estudo não foi observado qualquer diferença comportamental entre os sexos, na hiperalgisia térmica, desta maneira, foi dado continuidade aos experimentos com a utilização da droga teste NTX, tanto em animais machos como fêmeas.

Através de uma ampla revisão em base de dados Pubmed/Medline, LILACS e Scielo, não foram encontrados estudos experimentais e/ou clínicos que avaliassem o potencial analgésico da ULDN em condições de DOF aguda pós-operatória.

Contudo, alguns estudos experimentais demonstraram o potencial analgésico da NTX tanto por via sistêmica (i.p.), quanto em associação a dose subterapêutica de morfina (SHEN & CRAIN, 1997; POWELL *et al.*, 2002; HAMANN *et al.*, 2004), como também por via i.t. (MATTIOLLI *et al.*, 2010), servindo desta maneira como parâmetro de dosagem para experimentos piloto em nosso laboratório.

Com base nestes trabalhos, três dosagens de NTX foram testadas com objetivo de determinar a dose eficaz capaz de reverter o quadro de hiperalgisia térmica no modelo de DPO orofacial, assim as seguintes doses foram avaliadas, a saber: NTX 5 ng/Kg, NTX 50 ng/Kg e NTX 500 ng/Kg (i.p.).

Dados iniciais desta pesquisa revelaram através do teste de hiperalgisia ao estímulo térmico, que somente a maior dose testada (NTX 500 ng/Kg) promoveu efeito analgésico, além de que os animais machos apresentaram resposta antinociceptiva com maior intervalo de analgesia quando comparados às fêmeas, corroborando estudos que referem que as fêmeas apresentam menor sensibilidade à NTX quando comparados aos machos (HAMANN *et al.*, 2004; NIETO *et al.*, 2018).

Baseado nestas informações, ficou definido a dose padrão que norteou todos experimentos subsequentes, bem como optou-se pela utilização de ratos machos, por apresentarem efeito mais prolongado da NTX. Entretanto, sabe-se a importância de incluir ambos os sexos nos estudos em dor e planeja-se incluir as fêmeas futuramente nessa avaliação. Em relação aos opioides, estudos sugerem que tanto sua ação quanto a potência analgésica, podem diferir entre sexos (HAMANN *et al.*, 2004; TERNER *et al.*, 2006).

Nossos resultados demonstraram que a NTX promoveu efeito anti-hiperalgésico em ambos os sexos, porém o efeito foi mais prolongado em ratos machos. Por outro lado, Hamann e colegas evidenciaram no teste de retirada da cauda, que a ULDN foi capaz de aumentar o efeito antinociceptivo da morfina em ratas fêmeas, mas não em machos (HAMANN *et al.*, 2004).

Entretanto, na pesquisa de Hamann, não houve grupo experimental tratado somente com NTX, no intuito de evidenciar seu potencial analgésico entre sexos, mas interessantemente foi observado que o tratamento isolado com morfina promoveu maior efeito analgésico em ratos machos do que em fêmeas, com  $AUC_{0-300 \text{ min}} = 512.9 \pm 92.2$  e  $310.0 \pm 100.0$  respectivamente, no teste de retirada de cauda (HAMANN *et al.*, 2004).

Da mesma maneira, Nieto e colegas também observaram diferenças entre sexo na capacidade da NTX em reduzir comportamentos apetitivos e de consumo de álcool em ratos, num modelo de autoadministração, e observaram que a NTX reduziu de maneira dose-dependente e seletiva o comportamento de consumo de álcool em animais machos, por outro lado reduziu apenas o comportamento apetitivo em fêmeas (NIETO *et al.*, 2018).

Dentro das avaliações comportamentais, também foi verificado o potencial analgésico da NTX frente ao estímulo mecânico através dos filamentos de von Frey.

Nossos resultados foram similares ao trabalho elaborado por de Oliveira e colegas que demonstraram a habilidade da NTX em reduzir a alodinia mecânica em modelo experimental de dor neuropática induzido por constrição de nervo infraorbital (de OLIVEIRA *et al.*, 2020).

Em conjunto, esses resultados indicam que a NTX pode trazer benefício no controle da DAPO orofacial. Nesse sentido, estudos clínicos mostram que o emprego de NLX em infusão, durante cirurgias lombares, resulta em redução da intensidade da dor, menor consumo de opioide no pós-operatório imediato e atenuação de efeitos adversos concernente aos opioides, tais como náusea e prurido (FIROUZIAN *et al.*, 2018; FIROUZIAN *et al.*, 2020).

Limitadas são as evidências da utilização da ULDN como analgésico em monoterapia, contudo já está bem documentado seu efeito na potencialização de analgesia induzida por opioides, evidenciada tanto em estudos experimentais como clínicos (SHEN & CRAIN, 1997; POWELL *et al.*, 2002; HAMANN *et al.*, 2004; MATTIOLLI *et al.*, 2010; WEBSTER *et al.*, 2006; FIROUZIAN *et al.*, 2018; FIROUZIAN *et al.*, 2020).

Trabalho conduzido por Shen & Crain evidenciou que camundongos tratados com ULDN 100 ng/Kg (i.p) resultou em aumento da analgesia induzida por subdose de morfina 3 mg/Kg através do teste comportamental de imersão de cauda em água

quente, além de inibir o desenvolvimento de tolerância e/ou dependência física (SHEN & CRAIN, 1997).

Seguindo essa mesma linha de raciocínio, Powell e colaboradores demonstraram que o tratamento sistêmico com NTX 10 ng/Kg isolada foi incapaz de promover analgesia no teste de retirada da cauda, contudo, quando em associação com morfina 7,5 mg/Kg, houve resposta analgésica superior quando em comparação à morfina isolada (POWELL *et al.*, 2002).

Ademais, Hamann e colegas determinaram que doses de NTX inferiores a 2000 ng/Kg são necessários para promover um aumento do efeito analgésico de uma dose subterapêutica de morfina, em ratos machos (HAMANN *et al.*, 2004).

Mattioli e colaboradores demonstraram que o tratamento intratecal com ULDN 5 ng/30 µl foi responsável por promover um aumento de latência para resposta ao estímulo térmico quando em associação com morfina, ao passo que tratamentos isolados não foram capazes de promover analgesia (MATTIOLLI *et al.*, 2010).

Assim, em concordância com a literatura científica, evidenciamos que a associação entre NTX e morfina (ambos em doses não terapêuticas) promoveu efeito anti-hiperalgésico, não observado com as drogas isoladas. Inúmeros mecanismos têm sido apresentados com objetivo de explicar o sinergismo entre estes fármacos, que pode estar relacionado com o efeito da NTX em ligar-se aos receptores opioides, os quais estão expressos tanto na periferia como SNC, que será discutido a seguir (LARGENT-MILNES *et al.*, 2008; WEBSTER, 2007; CHINDALORE *et al.*, 2005).

Através da técnica de autorradiografia foi evidenciado que receptores MOP são amplamente expressos na periferia dos aferentes primários do nervo trigêmeo, que correspondem ao GT e também centralmente no Vc, que corresponde ao corno dorsal da medula, visto a similaridade morfofisiológica entre estas estruturas (BAGUES *et al.*, 2018; CHICHORRO *et al.*, 2017). De maneira intrigante, a expressão dos receptores MOP no GT é 44% superior quando comparado ao Vc, e é observado que em condições inflamatórias, ocorre um aumento destes receptores, cuja proteína é transportada para periferia, sendo capaz de interagir com agonistas opioides endógenos e exógenos (BAGUES *et al.*, 2018). Os receptores MOP também encontram-se amplamente expressos no Vc, principalmente nas lâminas I, II e III do trato de Lissauer, sendo a maior densidade na lâmina II, com expressão quase 3 vezes superior às demais lâminas (FAULL & VILLIGER, 1987), e o efeito

analgésico ocorre devido ação direta de agonistas opioides aos seus respectivos receptores opioides (WEBSTER, 2007).

Classicamente a morfina ativa os receptores MOP acoplados à proteína  $G_{i/o}$ , que inibe a atividade do adenilato ciclase, e conseqüentemente diminui os níveis neuronais do cAMP. Em região de membrana pré-sináptica, uma vez ativado os receptores MOP, ocorrerá a inibição dos Canais de Cálcio ( $Ca^{+2}$ ) e redução da liberação de neurotransmissores excitatórios, ao passo que em região de membrana pós-sináptica, acontecerá a abertura dos Canais de Potássio ( $K^{+1}$ ) e hiperpolarização dos neurônios, que resultará em inibição de atividade neural e conseqüente analgesia (POWELL *et al.*, 2002; LARGENT-MILNES *et al.*, 2008).

Portanto, se houver um shift nesta via de sinalização, a NTX irá bloquear os receptores MOP acoplados à proteína  $G_s$  e por conseqüência prevalecerá a ligação à proteína  $G_{i/o}$ , resultando em analgesia (LARGENT-MILNES *et al.*, 2008).

A fim de determinar possíveis sítios de ação da NTX no sistema sensorial trigeminal, foi avaliado o potencial analgésico da NTX injetado localmente em região intramucosa, e observamos que a injeção local intraoral de NTX não foi capaz de reverter o estímulo hiperalgésico térmico, mas a injeção nas proximidades do GT e Vc promoveram efeito analgésico, similar à aplicação sistêmica de NTX.

Esses dados estão em consonância com estudo de Bar e colegas, no qual foi demonstrado que diferentes antagonistas opioides (NTX, naltrindola, CTOP, nor-BNI) quando injetados perifericamente não apresentaram ação antinociceptiva no teste da formalina (BARR *et al.*, 2003).

Ademais, no estudo de Jasmin e colaboradores, foi observado em modelo de dor inflamatória em pata traseira, induzido por Complexo Adjuvante de Freund (CFA), que o tratamento com NTX (s.c.) em região plantar, não foi capaz de reduzir a hiperalgesia mecânica (JASMIN *et al.*, 1998).

Tomados em conjunto, esses resultados indicam que, seja por questões farmacocinéticas e/ou farmacodinâmicas, a NTX não é capaz de produzir analgesia na periferia local.

Por outro lado, o tratamento de NTX injetado através das vias ganglionar trigeminal e subaracnóidea diretamente no GT e Vc, respectivamente, foram capazes de reduzir a hiperalgesia térmica no modelo de DPO orofacial.

Um dos mecanismos de ação atribuídos ao uso da NTX é de antagonizar os receptores TLR4, atuando como um modulador glial, cuja função é coibir a neuroinflamação (de OLIVEIRA *et al.*, 2020; HATTFIELD, 2020).

Evidências demonstram que o GT apresenta papel ativo na modulação das informações sensoriais trigeminais, e que o aumento de expressão do TLR4 nessa estrutura pode contribuir para geração e/ou perpetuação da sintomatologia dolorosa (LIN *et al.*, 2015; ARAYA *et al.*, 2020<sup>a</sup>).

Importante salientar que o GT se encontra fora da barreira hematoencefálica, ou seja, é uma estrutura periférica de modulação da dor (ARAYA *et al.*, 2020<sup>a</sup>).

Estudos evidenciam que o bloqueio dos receptores TLR4 no GT e Vc são capazes de diminuir tanto a hiperalgesia térmica como mecânica em modelos de dor inflamatória e neuropática (LIN *et al.*, 2015; ARAYA *et al.*, 2020<sup>a</sup>), dados esses que corroboram os achados aqui apresentados.

Nossos resultados sugerem que a ULDN apresenta ação antinociceptiva via SNC, pois houve efeito analgésico provavelmente por antagonizar os receptores TLR4 presentes no Vc, ademais sugerimos que a ação antinociceptiva também ocorra por via SNP, visto que houve diminuição da latência para resposta ao estímulo térmico, quando injetado diretamente no GT.

Evidências sugerem a capacidade da ULDN em inibir a ativação glial e a produção de citocinas pró-inflamatórias na medula espinal, quando induzidas através da toxina pertussis (TSAI *et al.*, 2008) ou mesmo através do tratamento crônico com morfina (MATTIOLI *et al.*, 2010), contudo a capacidade da ULDN em interferir nas vias de sinalização do TLR4 ainda não foram totalmente esclarecidas.

O ligante endógeno que reconhece predominantemente o TLR4 é a endotoxina LPS, que é um componente da membrana externa de bactérias gram-negativas (PŁOCIENNIKOWSKA *et al.*, 2015) capaz de elicitar resposta imune via receptor TLR4 dependente (WANG *et al.*, 2016; KAWANO *et al.*, 2016).

Diversos estudos clínicos revelam que a endotoxina LPS é prevalente em pacientes que realizaram intervenções cirúrgicas distintas, embora os níveis séricos sejam variados devido ao porte cirúrgico, contudo, a resposta clínica invariável foi de hiperalgesia (KAWANO *et al.*, 2016). Assim, pacientes submetidos a procedimentos cirúrgicos podem ter descargas diretas de lipopolissacarídeos na circulação sanguínea, através da manipulação da ferida cirúrgica infectada e/ou por rompimento da integridade tecidual (VALENZA *et al.*, 2009).

De maneira semelhante, estudos experimentais também reconhecem o LPS como indutor de hiperalgesia, inclusive em modelos de DPO por incisão plantar (KAWANO *et al.*, 2016) e incisão da mucosa oral (ARAYA *et al.*, 2020<sup>a</sup>).

Em nosso experimento foi observado que aplicação em mucosa intraoral de LPS promoveu diminuição da latência para resposta ao estímulo térmico, e o tratamento com ULDN sistêmica foi capaz de reverter este quadro hiperalgésico.

Esses dados estão em consonância com Araya e colegas que evidenciaram a presença de hiperalgesia ao estímulo térmico, após injeção de LPS em mucosa oral de ratos, e que a ativação periférica dos aferentes primários promoveu aumento da expressão de receptores TLR4 em região de GT (ARAYA *et al.*, 2020<sup>a</sup>), consequentemente propiciando neuroinflamação (CANT *et al.*, 2017).

Já está bem documentado que os receptores TLR4 são amplamente expressos em células gliais e também em diversas regiões nervosas do SNC, sendo ativados por PAMPs (estímulos exógenos) e DAMPs (estímulos endógenos) liberados por tecidos lesionados (ex. incisão operatória) e/ou estresse celular (LIN *et al.*, 2015). As vias de sinalização do TLR4 estão relacionadas com aumento da expressão de mediadores pró-inflamatórios (ex. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e NO), além de inúmeras evidências da contribuição destes receptores em condições de dor inflamatória e neuropática (KONG *et al.*, 2016; XU *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2016).

De maneira intrigante, há um aumento de evidências que demonstram maior nível de expressão do TLR4 em células do sistema autoimune de animais machos, quando comparados às fêmeas, inferindo que a estimulação pelo LPS resultará num maior aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias em células imunes de machos (PARKITNY & YOUNGER, 2017; WANG *et al.*, 2016; HAJJAR *et al.*, 2002; PIER *et al.*, 2007).

Assim, é possível supor, neste presente estudo, que as fêmeas dos ratos foram menos responsivas ao tratamento com NTX por apresentarem menor expressão de TLR4. Além disso, a falta de efeito anti-hiperalgésico da NTX quando administrado na mucosa intraoral, pode estar relacionado aos mecanismos subjacentes do TLR4 no GT, mas não na periferia, fato que contribuiu para hipersensibilidade nos aferentes trigeminais.

Diversos estudos demonstram que o aumento da expressão do TLR4 no sistema sensorial trigeminal desempenha importante papel no desenvolvimento da

hiperalgesia, sendo que o bloqueio do TLR4 por um antagonista, é capaz de reduzir tal sintomatologia (QI *et al.*, 2011; LIN *et al.*, 2015; ARAYA *et al.*, 2020<sup>a</sup>).

Quando ocorre ativação do TLR4, deflagra-se uma cascata pró-inflamatória no interior da célula em resposta ao estímulo aversivo, promovendo a liberação de vários mediadores, em particular o fator de necrose tumoral-  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina-6 (IL-6), óxido nítrico (NO) e interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) com função de mediar a neuroinflamação (CANT, 2017; LI *et al.*, 2016; YOUNGER, 2014).

Dentre estas substâncias pró-inflamatórias, o NO é reconhecido como uma importante molécula de sinalização neural, por essa razão, a detecção e mensuração de sua concentração representa um método reconhecido de avaliação da atividade do TLR4 (LI *et al.*, 2016).

Duas vias de sinalização são deflagradas pela ativação do TLR4, a via MyD88 e a via TRIF, as quais foram descritas na introdução. Wang e colaboradores sugerem que tanto a (+)-naltrexona, como (+)-naloxona, são antagonistas do TLR4 tendenciosos do TRIF. Em conjunto, esses autores têm demonstrado que a NTX inibe a liberação de NO e produção de TNF- $\alpha$  induzido pelo LPS em culturas celulares, de maneira independente do bloqueio da via NF- $\kappa$ B (WANG *et al.*, 2016). Nossos dados contrastam com estas observações, visto que não detectamos uma redução do TNF- $\alpha$  pela ULDN, mas descobrimos uma redução significativa de IL-1 $\beta$  e CXCL2, sugerindo que tais citocinas tenham sido geradas através da via NF- $\kappa$ B (De FILIPPO *et al.*, 2013; HU *et al.*, 2021). Vale mencionar que alguns estudos pré-clínicos e clínicos também demonstraram redução dos níveis da IL-1 $\beta$  após tratamento com LDN, corroborando nossos achados (PARKITNY & YOUNGER; 2017; KWILASZ *et al.*, 2020).

A razão para tal divergência necessita de maiores investigações, apesar de estar bem estabelecido a atribuição da via TLR4/NF- $\kappa$ B na hiperalgesia ao estímulo térmico, contudo ainda faltam investigações que abordem o papel desta via especificamente na hiperalgesia mecânica (ARAYA *et al.*, 2020<sup>a</sup>), assim como esclarecer o papel da proteína TRIF neste contexto, e em particular no desenvolvimento da DPO (XING *et al.*, 2018).

Importante salientar que a morfina é capaz de ativar as células gliais através de uma interação direta com a via de sinalização TLR4/NF- $\kappa$ B, e o bloqueio desta via através de antagonista opioide é capaz de promover analgesia, além de reduzir a



quadros de dependência e tolerância induzida pelo opioide (GESSI *et al.*, 2016; EIDSON & MURPHY, 2013).

O presente estudo demonstrou que o bloqueio dos receptores TLR4 através de uma única aplicação de LPS-RS diretamente no GT e Vc, não foi capaz de reverter a hiperalgesia ao estímulo térmico decorrente da incisão em mucosa intraoral. De maneira interessante, o tratamento com ULDN após bloqueio dos receptores TLR4 nestas mesmas estruturas nervosas, também não resultou em analgesia.

Esses dados estão em conformidade com Araya e colegas, que demonstraram que uma única aplicação intraganglionar de LPS-RS não reverteu a hiperalgesia térmica e mecânica em modelo de DPO orofacial por incisão em mucosa intraoral, porém duas aplicações diárias de LPS-RS já foram suficientes para aliviar o estado hiperalgésico por período aproximado de 24 horas, e três aplicações consecutivas do antagonista TLR4 promoveram analgesia sustentada durante os três dias do experimento (ARAYA *et al.*, 2020a).

De maneira similar, Lin e colegas demonstraram num modelo de pulpíte aguda que o bloqueio do TLR4 (três aplicações consecutivas) no GT diminuiu a sinalização do NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , além da resposta comportamental nociceptiva, indicando que a via de sinalização do TLR4 representa importante alvo terapêutico nas DOFs (LIN *et al.*, 2015).

No presente estudo, sugerimos que uma única aplicação de LPS-RS nas estruturas nervosas trigeminais foi capaz de bloquear temporariamente os receptores TLR4 presentes nestas regiões, e conseqüentemente impediram a ligação e ativação destes receptores por ação da NTX, impossibilitando assim a analgesia. Os achados sugerem que o bloqueio dos receptores TLR4 pela ULDN possam contribuir para o efeito analgésico no modelo de DAPO orofacial, fato que está em consonância com diversos estudos que demonstram similaridade deste mecanismo em doses maiores de NTX (CANT *et al.*, 2017; XU *et al.*, 2020; TROFIMOVITCH & BAUMRUCKER, 2019; TOLJAN & VROOMAN, 2018).

Estudos mostram que as citocinas pró-inflamatórias (ex. IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) possam desempenhar importante função no desenvolvimento da hiperalgesia mecânica associado a ativação dos receptores TLR4 (XING *et al.*, 2018), assim como facilitar a progressão de diversas doenças (LIN *et al.*, 2015; KONG *et al.*, 2016).

No terceiro dia após a incisão, não conseguimos detectar aumento dos mediadores inflamatórios no GT (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e SP), bem como não evidenciamos efeito da NTX nos níveis desses mediadores. É possível que o tempo selecionado para a coleta dos tecidos não seja adequado para a detecção de alterações significativas nos níveis desses mediadores.

Contudo, foi observado que o tratamento sistêmico prévio com ULDN foi capaz de reduzir a hiperalgesia térmica induzida por LPS submucoso, além de diminuir os níveis da citocina pró-inflamatória IL-1 $\beta$  no GT. Novamente, a falha em detectar uma alteração significativa nos níveis de TNF- $\alpha$ , pode estar relacionado ao tempo selecionado para a coleta dos tecidos, visto que a liberação das diferentes citocinas segue decursos temporais distintos.

O mecanismo de ação subjacente à redução da IL-1 $\beta$  necessita de maiores investigações, e pode estar correlacionado à via de ativação TLR4/NF- $\kappa$ B no GT (ARAYA *et al.*, 2020<sup>a</sup>; BAI *et al.*, 2019). Inclusive nosso grupo já demonstrou que o LPS deflagra hiperalgesia facial térmica e mecânica dependente desta via no próprio GT (ARAYA *et al.*, 2020<sup>a</sup>).

Diversos estudos indicam que a via TLR4/NF- $\kappa$ B contribuem para hipersensibilidade do sistema sensorial trigeminal, o que está de acordo com os dados aqui apresentados (KANNO *et al.*, 2020; HORIE *et al.*, 2017; SU *et al.*, 2018).

Em conjunto, esses resultados reforçam a importância desta via nos diferentes tipos de dor que envolvem a área de abrangência trigeminal, e sugerem a existência de um mecanismo para o efeito analgésico da ULDN no GT.

Por fim, os experimentos realizados em cultura de macrófagos RAW 264.7 mostrou que o tratamento com NTX ou LPS afetaram a viabilidade celular, porém mais de 80% estavam viáveis. Em adição, a menor concentração de NTX testada (0,1 ng/mL) ocasionou menor redução da viabilidade celular, porém maior inibição da liberação de NO dos macrófagos estimulados com LPS, em comparação às outras concentrações, sugerindo um efeito anti-inflamatório da NTX. Nessa concentração, a NTX também foi capaz de reduzir significativamente os níveis de IL-1 $\beta$  e da quimiocina CXCL-2 na cultura de macrófagos estimulados pelo LPS (ligante TLR4). Mais uma vez observamos que o LPS não foi capaz de promover aumento dos níveis TNF- $\alpha$ , fato este que pode estar relacionado ao intervalo de tempo

escolhido, assim como outros fatores que regulam a expressão desta citocina (CAVAILLON, 2018).

De maneira semelhante, no estudo de Cant e colegas foi reportado que a NTX não afeta a viabilidade celular e/ou induz apoptose de células sanguíneas, e demonstrou-se que a NTX foi capaz de inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias (ex. IL-6 e TNF- $\alpha$ ), mas não a IL-1, em células sanguíneas mononucleares periféricas, após serem ativadas por ligantes TLR7, TLR8 e TLR9, mas não estimulada pelo ligante TLR4 (CANT *et al.*, 2017).

Notadamente, o NO é reconhecido por induzir a expressão da IL-1 $\beta$  em experimentos animais, bem como produção de outras citocinas pró-inflamatórias, sugerindo que a NTX possa exercer um efeito modulatório sobre a produção da IL-1 $\beta$  (HOLGUIN *et al.*, 2004), da mesma maneira que também inibe a atividade do NF- $\kappa$ B (XU *et al.*, 2020). No conjunto, esses elementos corroboram os resultados aqui apresentados.

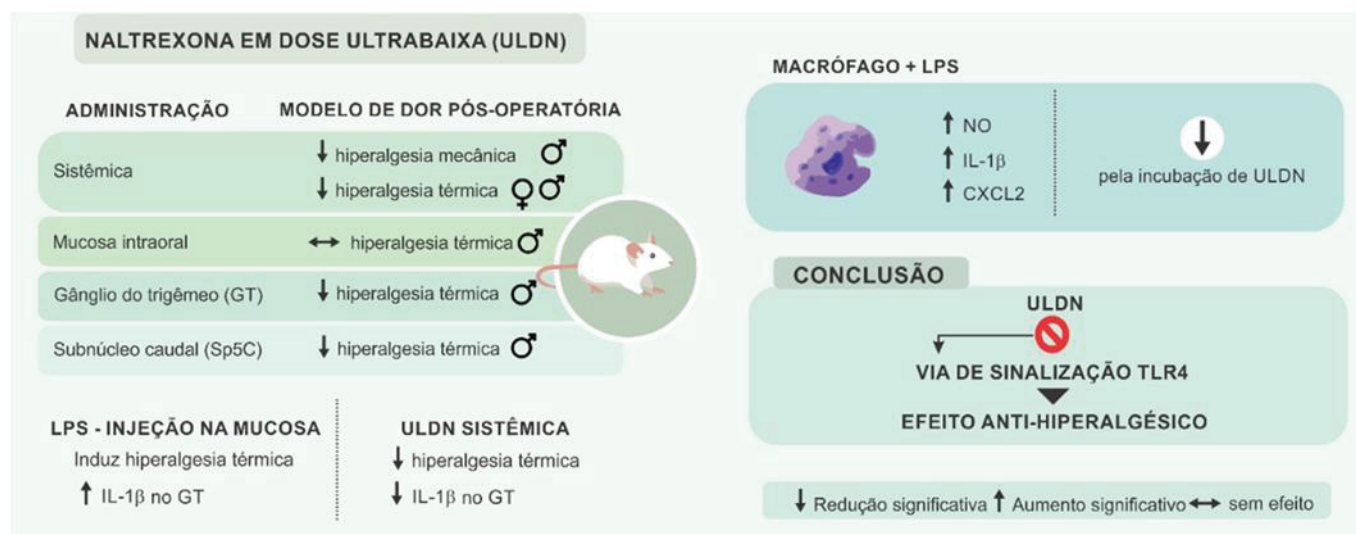
Também observamos que os macrófagos estimulados pelo LPS aumentaram os níveis de CXCL-2, resultado que está em concordância com estudos prévios (de FILIPPO *et al.*, 2013; QIN *et al.*, 2017). Ademais, a liberação de CXCL-2 por macrófagos estimulados por LPS são considerados dependentes da via de sinalização TLR4/NF- $\kappa$ B (de FILIPPO *et al.*, 2013), fato que sustenta a hipótese da ULDN atuar nesta via de sinalização e possivelmente na mediação do recrutamento de neutrófilos em resposta ao LPS.

Já está bem estabelecido que a CXCL-2 é uma proteína que age como ligante do receptor de quimiocina CXCR-2, o qual é expresso em diferentes tipos de leucócitos, e desempenham importante papel no recrutamento de neutrófilos no local do processo inflamatório (OLSON & LEY, 2002), sendo considerados as primeiras células a penetrarem no tecido inflamado ou infectado (de FILIPPO *et al.*, 2013).

Num contexto geral, os dados aqui demonstrados estão em consonância com estudos que evidenciaram a capacidade da NTX e NLX em reduzir a produção de citocinas e NO em culturas celulares estimuladas pelo LPS (LIU & HONG, 2003; YI *et al.*, 2016). Curiosamente, este efeito ocorre de maneira independente da ativação dos receptores opioides, mas sim, é resultado da ativação glial, e devido ao papel determinante que a micróglia desempenha em várias doenças de cunho neuro-inflamatória, inclusive na dor crônica, as propriedades neuroprotetivas da NTX e NLX merecem ser exploradas (LIU & HONG, 2003).

## 6 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo demonstraram de maneira inédita a importante ação anti-hiperalgésica da ULDN em um modelo de DAPO orofacial. A ULDN apresentou efeito antinociceptivo periférico (relacionado ao GT) e central (relacionado ao Vc) e sugere-se que o bloqueio dos receptores TLR4 e sua via de sinalização, possam contribuir de maneira significativa para o efeito da NTX nessas estruturas. Ademais foi observado o potencial antinociceptivo da ULDN quando utilizada em associação com a morfina, o que pode trazer benefícios no controle da dor pós-operatória. A figura abaixo sumariza os resultados obtidos no presente estudo. Entretanto, mais estudos são necessários para melhor elucidação dos possíveis mecanismos de ação da ULDN, bem como do benefício do seu emprego em diferentes tipos de DOF.



## 7 REFERÊNCIAS

ABUL-HUSN, N. S. et al. Augmentation of spinal morphine analgesia and inhibition of tolerance by low doses of  $\mu$ -and  $\delta$ -opioid receptor antagonists. **British journal of pharmacology**, v. 151, n. 6, p. 877-887, 2007.

ARAYA, Erika Ivanna et al. Toll-like receptor 4 (TLR4) signaling in the trigeminal ganglion mediates facial mechanical and thermal hyperalgesia in rats. **Physiology & Behavior**, v. 226, p. 113127, 2020. a

ARAYA, Erika Ivanna et al. Acute orofacial pain leads to prolonged changes in behavioral and affective pain components. **Pain**, v. 161, n. 12, p. 2830-2840, 2020.b.

ARAYA, Erika Ivanna et al. Role of peripheral and central TRPV1 receptors in facial heat hyperalgesia in streptozotocin-induced diabetic rats. **Brain Research**, v. 1670, p. 146-155, 2017.

ARGOFF, Charles E. Recent management advances in acute postoperative pain. **Pain Practice**, v. 14, n. 5, p. 477-487, 2014.

BACH, Anne Mette; FORMAN, Axel; SEIBAEK, Lene. Postoperative pain management: a bedside perspective. **Pain Management Nursing**, v. 19, n. 6, p. 608-618, 2018.

BAGUES, Ana et al. Mu-opioid receptors in ganglia, but not in muscle, mediate peripheral analgesia in rat muscle pain. **Anesthesia & Analgesia**, v. 126, n. 4, p. 1369-1376, 2018.

BAI, Qian et al. TNF $\alpha$  in the trigeminal nociceptive system is critical for temporomandibular joint pain. **Molecular neurobiology**, v. 56, n. 1, p. 278-291, 2019.

BAILEY, Edmund; BAILEY, Edmund. Prevention and Management of Postoperative Pain in Oral Surgery. **Primary Dental Journal**, v. 7, n. 3, p. 57-63, 2018.

BATHLA, G.; HEGDE, A. N. The trigeminal nerve: an illustrated review of its imaging anatomy and pathology. **Clinical radiology**, v. 68, n. 2, p. 203-213, 2013.

BATLOUNI, Michel. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: cardiovascular, cerebrovascular and renal effects. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 94, p. 556-563, 2010.

BARR, Gordon A. et al. Analgesia induced by local plantar injections of opiates in the formalin test in infant rats. **Developmental Psychobiology: The Journal of the International Society for Developmental Psychobiology**, v. 42, n. 2, p. 111-122, 2003.

BENDER, Steven D. Orofacial Pain: Where We Are and Where We Are Going. **Dental Clinics**, v. 62, n. 4, p. ix-x, 2018.

BORSODI, Anna et al. Opioid receptors (version 2019.4) in the IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology Database. **IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology CITE**, v. 2019, n. 4, 2019.

BREE, Dara et al. Development and characterization of a novel, anatomically relevant rat model of acute postoperative pain. **The Journal of Pain**, v. 16, n. 5, p. 421-435. e6, 2015.

CANT, Rachel; DALGLEISH, Angus G.; ALLEN, Rachel L. Naltrexone inhibits IL-6 and TNF $\alpha$  production in human immune cell subsets following stimulation with ligands for intracellular toll-like receptors. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 809, 2017.

CAVAILLON, Jean-Marc. Exotoxins and endotoxins: Inducers of inflammatory cytokines. **Toxicon**, v. 149, p. 45-53, 2018.

CHICHORRO, Juliana Geremias et al. Orofacial cold hyperalgesia due to infraorbital nerve constriction injury in rats: reversal by endothelin receptor antagonists but not non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Pain**, v. 123, n. 1-2, p. 64-74, 2006.

CHICHORRO, Juliana G. et al. Mechanisms operated by endothelin ETA and ETB receptors in the trigeminal ganglion contribute to orofacial thermal hyperalgesia induced by infraorbital nerve constriction in rats. **Neuropeptides**, v. 43, n. 2, p. 133-142, 2009.

CHICHORRO, Juliana Geremias; PORRECA, Frank; SESSLE, Barry. Mechanisms of craniofacial pain. **Cephalalgia**, v. 37, n. 7, p. 613-626, 2017.

CHINDALORE, Vishala L. et al. Adding ultralow-dose naltrexone to oxycodone enhances and prolongs analgesia: a randomized, controlled trial of Oxytrex. **The Journal of Pain**, v. 6, n. 6, p. 392-399, 2005.

COMISSÃO DE NOMENCLATURA DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ANATOMIA. **Nomina Anatômica** . 5. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1987.

CORDER, Gregory et al. Endogenous and exogenous opioids in pain. **Annual review of neuroscience**, v. 41, p. 453, 2018.

CRAIN, Stanley M.; SHEN, Ke-Fei. Modulatory effects of Gs-coupled excitatory opioid receptor functions on opioid analgesia, tolerance, and dependence. **Neurochemical research**, v. 21, n. 11, p. 1347-1351, 1996.

CRANDALL, Jeffrey A. An introduction to orofacial pain. **Dental Clinics**, v. 62, n. 4, p. 511-523, 2018.

CRUCIANI, Ricardo A. et al. Ultra-low dose oral naltrexone decreases side effects and potentiates the effect of methadone. **Journal of pain and symptom management**, v. 25, n. 6, p. 491-494, 2003.

DE FILIPPO, Katia et al. Mast cell and macrophage chemokines CXCL1/CXCL2 control the early stage of neutrophil recruitment during tissue inflammation. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 121, n. 24, p. 4930-4937, 2013.

DE OLIVEIRA, Camila Lino et al. Low-dose naltrexone reverses facial mechanical allodynia in a rat model of trigeminal neuralgia. **Neuroscience Letters**, v. 736, p. 135248, 2020.

DODSON, Tom. Paracetamol is an effective drug to use for pain following oral surgery. **Evidence-based dentistry**, v. 8, n. 3, p. 79-80, 2007.

EIDSON, Lori N.; MURPHY, Anne Z. Blockade of Toll-like receptor 4 attenuates morphine tolerance and facilitates the pain relieving properties of morphine. **Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 40, p. 15952-15963, 2013.

FAULL, R. L. M.; VILLIGER, J. W. Opiate receptors in the human spinal cord: a detailed anatomical study comparing the autoradiographic localization of [3H] diprenorphine binding sites with the laminar pattern of substance P, myelin and nissl staining. **Neuroscience**, v. 20, n. 2, p. 395-407, 1987.

FIROUZIAN, Abolfazl et al. The Effect of Ultra–low-dose Intrathecal Naloxone on Pain Intensity After Lumbar Laminectomy With Spinal Fusion: A Randomized Controlled Trial. **Journal of Neurosurgical Anesthesiology**, v. 32, n. 1, p. 70-76, 2020.

FIROUZIAN, Abolfazl et al. Ultra–low-dose naloxone as an adjuvant to patient controlled analgesia (PCA) with morphine for postoperative pain relief following lumbar discectomy: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. **Journal of neurosurgical anesthesiology**, v. 30, n. 1, p. 26-31, 2018.

FISCHER, Luana; PARADA, Carlos Amílcar; TAMBELI, Cláudia Herrera. 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.



FERREIRA, Luiz EN et al. Effects of lidocaine and the inclusion complex with 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin on cell viability and proliferation of oral squamous cell carcinoma. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 70, n. 7, p. 874-882, 2018.

GESSI, Stefania et al. The activation of  $\mu$ -opioid receptor potentiates LPS-induced NF- $\kappa$ B promoting an inflammatory phenotype in microglia. **FEBS letters**, v. 590, n. 17, p. 2813-2826, 2016.

GIRONI, Maira et al. A pilot trial of low-dose naltrexone in primary progressive multiple sclerosis. **Multiple Sclerosis Journal**, v. 14, n. 8, p. 1076-1083, 2008.

GLARE, Paul; AUBREY, Karin R.; MYLES, Paul S. Transition from acute to chronic pain after surgery. **The Lancet**, v. 393, n. 10180, p. 1537-1546, 2019.

GROSS, Jessica Lynn; PERATE, Alison R.; ELKASSABANY, Nabil M. Pain management in trauma in the age of the opioid crisis. **Anesthesiology clinics**, v. 37, n. 1, p. 79-91, 2019.

HAJJAR, Adeline M. et al. Human Toll-like receptor 4 recognizes host-specific LPS modifications. **Nature immunology**, v. 3, n. 4, p. 354-359, 2002.

HALPERN, Leslie; WILLIS, Porchia. Orofacial pain: Pharmacologic paradigms for therapeutic intervention. **Dental Clinics**, v. 60, n. 2, p. 381-405, 2016.

HAMANN, Scott R. et al. Interactions of "ultra-low" doses of naltrexone and morphine in mature and young male and female rats. **Receptors and Channels**, v. 10, n. 2, p. 73-81, 2004.

HATFIELD, Elizabeth et al. Use of low-dose naltrexone in the management of chronic pain conditions: a systematic review. **The Journal of the American Dental Association**, v. 151, n. 12, p. 891-902. e1, 2020.

HAY, J. L. et al. Potentiation of buprenorphine antinociception with ultra-low dose naltrexone in healthy subjects. **European Journal of Pain**, v. 15, n. 3, p. 293-298, 2011.

HERSH, Elliot V.; BALASUBRAMANIAM, Ramesh; PINTO, Andres. Pharmacologic management of temporomandibular disorders. **Oral and maxillofacial surgery clinics of North America**, v. 20, n. 2, p. 197-210, 2008.

HOLGUIN, Adelina et al. HIV-1 gp120 stimulates proinflammatory cytokine-mediated pain facilitation via activation of nitric oxide synthase-I (nNOS). **Pain**, v. 110, n. 3, p. 517-530, 2004.

HÖRL, Walter H. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the kidney. **Pharmaceuticals**, v. 3, n. 7, p. 2291-2321, 2010.

HORIE, Kayo et al. Bovine lactoferrin reduces extra-territorial facial allodynia/hyperalgesia following a trigeminal nerve injury in the rat. **Brain Research**, v. 1669, p. 89-96, 2017.

HU, Dan-Ning et al. Cultured human uveal melanocytes express/secrete CXCL1 and CXCL2 constitutively and increased by lipopolysaccharide via activation of toll-like receptor 4. **Current Eye Research**, v. 46, n. 11, p. 1681-1694, 2021.

ICOP. International Classification of Orofacial Pain, (ICOP). **Cephalalgia**, v. 40, n. 2, p. 129-221, 2020.

JASMIN, Luc et al. The cold plate as a test of nociceptive behaviors: description and application to the study of chronic neuropathic and inflammatory pain models. **Pain**, v. 75, n. 2-3, p. 367-382, 1998.

JÓŹWIAK-BEBENISTA, Marta; NOWAK, Jerzy Z. Paracetamol: mechanism of action, applications and safety concern. **Acta poloniae pharmaceutica**, v. 71, n. 1, p. 11-23, 2014.

JULIUS, David; BASBAUM, Allan I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, n. 6852, p. 203-210, 2001.

KANNO, Kohei et al. Role of macrophage-mediated Toll-like receptor 4–interleukin-1R signaling in ectopic tongue pain associated with tooth pulp inflammation. **Journal of Neuroinflammation**, v. 17, n. 1, p. 1-15, 2020.

KAWANO, Takashi et al. Effects and underlying mechanisms of endotoxemia on post-incisional pain in rats. **Life sciences**, v. 148, p. 145-153, 2016.

KHAN, Junad et al. Acute and chronic pain in orofacial trauma patients. **Journal of Endodontics**, v. 45, n. 12, p. S28-S38, 2019.

KHOULY, Ismael et al. Post-operative pain management in dental implant surgery: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. **Clinical Oral Investigations**, v. 25, n. 5, p. 2511-2536, 2021.

KIM, Phillip S.; FISHMAN, Michael A. Low-dose naltrexone for chronic pain: update and systemic review. **Current Pain and Headache Reports**, v. 24, n. 10, p. 1-8, 2020.

KONG, Jingjing et al. Effect of toll-like receptor 4 on synovial injury of temporomandibular joint in rats caused by occlusal interference. **Mediators of Inflammation**, v. 2016, 2016.

KWILASZ, Andrew J. et al. Toll-like receptor 2 and 4 antagonism for the treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)-related pain. **Brain, behavior, and immunity**, v. 93, p. 80-95, 2021.

LATRÉMOLIÈRE, Alban et al. Differential implication of proinflammatory cytokine interleukin-6 in the development of cephalic versus extracephalic neuropathic pain in rats. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 34, p. 8489-8501, 2008.

LARGENT-MILNES, Tally M. et al. Oxycodone plus ultra-low-dose naltrexone attenuates neuropathic pain and associated  $\mu$ -opioid receptor–Gs coupling. **The journal of pain**, v. 9, n. 8, p. 700-713, 2008.

LAZARINI, Josy Goldoni et al. Anti-inflammatory and antioxidant potential, in vivo toxicity, and polyphenolic composition of *Eugenia selloi* BD Jacks.(pitangatuba), a Brazilian native fruit. **Plos one**, v. 15, n. 6, p. e0234157, 2020.

LEE, Marion et al. A comprehensive review of opioid-induced hyperalgesia. **Pain physician**, v. 14, n. 2, p. 145, 2011.

LI, Jing et al. Therapeutic developments targeting toll-like receptor-4-mediated neuroinflammation. **ChemMedChem**, v. 11, n. 2, p. 154-165, 2016.

LIN, Jia-Ji et al. Toll-like receptor 4 signaling in neurons of trigeminal ganglion contributes to nociception induced by acute pulpitis in rats. **Scientific reports**, v. 5, n. 1, p. 1-14, 2015.

LIN, Cong et al. TLR4 biased small molecule modulators. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 228, p. 107918, 2021.

LIU, Janet C. et al. Naltrexone metabolism and concomitant drug concentrations in chronic pain patients. **Journal of analytical toxicology**, v. 38, n. 4, p. 212-217, 2014.

LIU, B. I. N.; HONG, Jau-Shyong. Role of microglia in inflammation-mediated neurodegenerative diseases: mechanisms and strategies for therapeutic intervention. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 304, n. 1, p. 1-7, 2003.

MATTIOLI, Theresa-Alexandra M.; MILNE, Brian; CAHILL, Catherine M. Ultra-low dose naltrexone attenuates chronic morphine-induced gliosis in rats. **Molecular pain**, v. 6, n. 1, p. 1-11, 2010.

MATTSON, Christine L. et al. Trends and geographic patterns in drug and synthetic opioid overdose deaths—United States, 2013–2019. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 70, n. 6, p. 202, 2021.

MCGILL, Mitchell R.; JAESCHKE, Hartmut. Metabolism and disposition of acetaminophen: recent advances in relation to hepatotoxicity and diagnosis. **Pharmaceutical research**, v. 30, n. 9, p. 2174-2187, 2013.

NEUBERT, John K. et al. Peripheral targeting of the trigeminal ganglion via the infraorbital foramen as a therapeutic strategy. **Brain research protocols**, v. 15, n. 3, p. 119-126, 2005.

NEUMAN, Mark D.; BATEMAN, Brian T.; WUNSCH, Hannah. Inappropriate opioid prescription after surgery. **The Lancet**, v. 393, n. 10180, p. 1547-1557, 2019.

NIETO, Steven J.; QUAVE, Cana B.; KOSTEN, Therese A. Naltrexone alters alcohol self-administration behaviors and hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in a sex-dependent manner in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 167, p. 50-59, 2018.

NOSRAT, Ali et al. Postoperative pain: an analysis on evolution of research in half-century. **Journal of Endodontics**, v. 47, n. 3, p. 358-365, 2021.

OLSON, Timothy S.; LEY, Klaus. Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 283, n. 1, p. R7-R28, 2002.

PAQUETTE, Jay; OLMSTEAD, Mary. Ultra-low dose naltrexone enhances cannabinoid-induced antinociception. **Behavioural pharmacology**, v. 16, n. 8, p. 597-603, 2005.

PATHAN, Hasan; WILLIAMS, John. Basic opioid pharmacology: an update. **British journal of pain**, v. 6, n. 1, p. 11-16, 2012.

PATEL, Nisarg A.; AFSHAR, Salim. Addressing the high rate of opioid prescriptions for dental pain in the emergency department. **The American Journal of Emergency Medicine**, v. 36, n. 1, p. 138-139, 2018.

PATTEN, Denise K.; SCHULTZ, Bob G.; BERLAU, Daniel J. The safety and efficacy of low-dose naltrexone in the management of chronic pain and inflammation in multiple sclerosis, fibromyalgia, Crohn's disease, and other chronic pain disorders. **Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy**, v. 38, n. 3, p. 382-389, 2018.

PATWARDHAN, Amol et al. The opioid crisis and... reconsidering the use of drugs that affect body temperature. **Temperature**, v. 5, n. 1, p. 1-3, 2018.

PARKITNY, Luke; YOUNGER, Jarred. Reduced pro-inflammatory cytokines after eight weeks of low-dose naltrexone for fibromyalgia. **Biomedicines**, v. 5, n. 2, p. 16, 2017.

PIER, Gerald B. Pseudomonas aeruginosa lipopolysaccharide: a major virulence factor, initiator of inflammation and target for effective immunity. **International journal of medical microbiology**, v. 297, n. 5, p. 277-295, 2007.

PIGG, Maria et al. New international classification of orofacial pain: what is in it for endodontists?. **Journal of Endodontics**, v. 47, n. 3, p. 345-357, 2021.

PINEDA-FARIAS, Jorge B. et al. Ultra-low doses of naltrexone enhance the antiallodynic effect of pregabalin or gabapentin in neuropathic rats. **Drug Development Research**, v. 78, n. 8, p. 371-380, 2017.

PIOVESAN, Elcio J.; KOWACS, Pedro A.; OSHINSKY, Michael L. Convergence of cervical and trigeminal sensory afferents. **Current pain and headache reports**, v. 7, n. 5, p. 377-383, 2003.

PŁÓCIENNIKOWSKA, Agnieszka et al. Co-operation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling. **Cellular and molecular life sciences**, v. 72, n. 3, p. 557-581, 2015.

POGATZKI-ZAHN, Esther; SEGELCKE, Daniel; ZAHN, Peter. Mechanisms of acute and chronic pain after surgery: update from findings in experimental animal models. **Current Opinion in Anesthesiology**, v. 31, n. 5, p. 575-585, 2018.

PORPORATTI, André Luís et al. Effect of topical anaesthesia in patients with persistent dentoalveolar pain disorders: A quantitative sensory testing evaluation. **Archives of Oral Biology**, v. 60, n. 7, p. 973-981, 2015.

POWELL, Kelly J. et al. Paradoxical effects of the opioid antagonist naltrexone on morphine analgesia, tolerance, and reward in rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 300, n. 2, p. 588-596, 2002.

QI, Jia et al. Painful pathways induced by TLR stimulation of dorsal root ganglion neurons. **The Journal of Immunology**, v. 186, n. 11, p. 6417-6426, 2011.

QIN, Chao-Chao et al. Macrophage inflammatory protein-2 as mediator of inflammation in acute liver injury. **World journal of gastroenterology**, v. 23, n. 17, p. 3043-3052, 2017.

RODRIGUE, Debra et al. Opioid Misuse: An organizational response while managing cancer-related pain. **Clinical Journal of Oncology Nursing**, v. 24, n. 2, 170-176. 2020.

ROTPENPIAN, Nattapon; YAKKAPHAN, Pankeaw. Review of literatures: Physiology of Orofacial Pain in dentistry. **Eneuro**, v. 8, n. 2, 2021.

SENESE, Nicolas B. et al. Regulator of G-protein signaling (RGS) protein modulation of opioid receptor signaling as a potential target for pain management. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 13, p. 5, 2020.

SHANKLAND, Wesley E. The trigeminal nerve. Part I: An over-view. **CRANIO®**, v. 18, n. 4, p. 238-248, 2000.

SHANKLAND, Wesley E. The trigeminal nerve. Part II: the ophthalmic division. **CRANIO®**, v. 19, n. 1, p. 8-12, 2001.a

SHANKLAND, Wesley E. The trigeminal nerve. Part III: The maxillary division. **CRANIO®**, v. 19, n. 2, p. 78-83, 2001. b

SHANKLAND, Wesley E. The trigeminal nerve. Part IV: the mandibular division. **CRANIO®**, v. 19, n. 3, p. 153-161, 2001. c

SHEN, Ke-Fei; CRAIN, Stanley M. Ultra-low doses of naltrexone or etorphine increase morphine's antinociceptive potency and attenuate tolerance/dependence in mice. **Brain research**, v. 757, n. 2, p. 176-190, 1997.

SHINODA, Masamichi et al. Peripheral and central mechanisms of persistent orofacial pain. **Frontiers in Neuroscience**, v. 13, p. 1227, 2019.

SHINODA, Masamichi et al. Nerve growth factor contribution via transient receptor potential vanilloid 1 to ectopic orofacial pain. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 19, p. 7145-7155, 2011.

SU, Min et al. Inhibition of toll-like receptor 4 alleviates hyperalgesia induced by acute dural inflammation in experimental migraine. **Molecular pain**, v. 14, p. 1744806918754612, 2018.

TEMPEL, A.; GARDNER, E. L.; ZUKIN, R. S. Neurochemical and functional correlates of naltrexone-induced opiate receptor up-regulation. **Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 232, n. 2, p. 439-444, 1985.

TERNER, Jolan M. et al. Influence of low doses of naltrexone on morphine antinociception and morphine tolerance in male and female rats of four strains. **Pain**, v. 122, n. 1-2, p. 90-101, 2006.



TOLJAN, Karlo; VROOMAN, Bruce. Low-dose naltrexone (LDN)—review of therapeutic utilization. **Medical Sciences**, v. 6, n. 4, p. 82, 2018.

TRAYNOR, John.  $\mu$ -Opioid receptors and regulators of G protein signaling (RGS) proteins: from a symposium on new concepts in mu-opioid pharmacology. **Drug and alcohol dependence**, v. 121, n. 3, p. 173-180, 2012.

TROFIMOVITCH, Diana; BAUMRUCKER, Steven J. Pharmacology update: low-dose naltrexone as a possible nonopioid modality for some chronic, nonmalignant pain syndromes. **American Journal of Hospice and Palliative Medicine®**, v. 36, n. 10, p. 907-912, 2019.

TSAI, Ru-Yin et al. Ultra-low-dose naloxone restores the antinociceptive effect of morphine and suppresses spinal neuroinflammation in PTX-treated rats. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, n. 11, p. 2772-2782, 2008.

URATA, 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.

URATA, K. et al. Involvement of transient receptor potential vanilloid 2 in intra-oral incisional pain. **Oral Diseases**, v. 24, n. 6, p. 1093-1100, 2018.

VALENZA, Franco et al. Prevalence of endotoxemia after surgery and its association with ICU length of stay. **Critical care**, v. 13, n. 3, p. 1-8, 2009.

VASQUENZA, Kelly et al. Pain management for children during bone marrow and stem cell transplantation. **Pain Management Nursing**, v. 16, n. 3, p. 156-162, 2015.

XIAO, Y. et al. A randomized clinical trial of the effects of ultra-low-dose naloxone infusion on postoperative opioid requirements and recovery. **Acta Anaesthesiologica Scandinavica**, v. 59, n. 9, p. 1194-1203, 2015.

XING, Fei et al. TLR4/NF- $\kappa$ B signaling activation in plantar tissue and dorsal root ganglion involves in the development of postoperative pain. **Molecular Pain**, v. 14, p. 1744806918807050, 2018.

XU, Neili et al. Naltrexone (NTX) relieves inflammation in the collagen-induced-arthritis (CIA) rat models through regulating TLR4/NF $\kappa$ B signaling pathway. **International Immunopharmacology**, v. 79, p. 106056, 2020.

WANG, X. et al. Pharmacological characterization of the opioid inactive isomers (+)-naltrexone and (+)-naloxone as antagonists of toll-like receptor 4. **British journal of pharmacology**, v. 173, n. 5, p. 856-869, 2016.

WANG, H.-Y. et al. Ultra-low-dose naloxone suppresses opioid tolerance, dependence and associated changes in Mu opioid receptor–G protein coupling and G $\beta$  $\gamma$  signaling. **Neuroscience**, v. 135, n. 1, p. 247-261, 2005.

WEBSTER, Lynn R. et al. Oxytrex minimizes physical dependence while providing effective analgesia: a randomized controlled trial in low back pain. **The Journal of Pain**, v. 7, n. 12, p. 937-946, 2006.

WEBSTER, Lynn R. Oxytrex®: an oxycodone and ultra-low-dose naltrexone formulation. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 16, n. 8, p. 1277-1283, 2007.

WILLIAMS, John T. et al. Regulation of  $\mu$ -opioid receptors: desensitization, phosphorylation, internalization, and tolerance. **Pharmacological reviews**, v. 65, n. 1, p. 223-254, 2013.

WRIGHT, Eric R. et al. The iatrogenic epidemic of prescription drug abuse: county-level determinants of opioid availability and abuse. **Drug and alcohol dependence**, v. 138, p. 209-215, 2014.

YI, Zhe et al. Functional modulation on macrophage by low dose naltrexone (LDN). **International immunopharmacology**, v. 39, p. 397-402, 2016.

YOBURN, BYRON C.; COHEN, ALAN H.; INTURRISI, CHARLES E. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of subcutaneous naltrexone pellets in the rat. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 237, n. 1, p. 126-130, 1986.

YOUNGER, Jarred; PARKITNY, Luke; MCLAIN, David. The use of low-dose naltrexone (LDN) as a novel anti-inflammatory treatment for chronic pain. **Clinical rheumatology**, v. 33, n. 4, p. 451-459, 2014.

ZYLICZ, Zbigniew; STORK, Neeltje; KRAJNIK, Małgorzata. Severe pruritus of cholestasis in disseminated cancer: developing a rational treatment strategy. A case report. **Journal of pain and symptom management**, v. 29, n. 1, p. 100-103, 2005.

## I. ANEXO 1: APROVAÇÃO DO CEUA



Nº 1263

### CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR), instituída pela Resolução Nº 86/11 do Conselho de Ensino Pesquisa e Extensão (CEPE), de 22 de dezembro de 2011, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA) estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal.

### STATEMENT

The Ethics Committee for Animal Use from the Biological Sciences Section of the Federal University of Paraná (CEUA/BIO – UFPR), established by the Resolution Nº 86/11 of the Teaching Research and Extension Council (CEPE) on December 22<sup>nd</sup> 2011, **CERTIFIES** that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the Brazilian Guidelines for Care and Use of Animals for Scientific and Teaching purposes established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and with the international guidelines for animal experimentation.

**PROCESSO/PROCESS:** 23075.022705/2019-28

**APROVADO/APPROVAL:** 23/04/2019 – R.O. 03/2019

**TÍTULO:** Avaliação do efeito antinociceptivo da Naltrexona em baixa dose em modelo de dor orofacial pós-operatória em ratos.

**TITLE:** Evaluation of the antinociceptive effect of low dose Naltrexone in orofacial postoperative pain model in rats.

**AUTORES/AUTHORS:** Juliana GeremiasChichorro, Wagner Hummig, Joelle de Melo Turnes.

**DEPARTAMENTO/DEPARTMENT:** Farmacologia

Profa. Dra. Katya Naliwaiko  
Coordenadora da CEUA



Documento assinado eletronicamente por **ISELEN ABREU FLORENTINO IVANOSKI, MEDICO VETERINARIO**, em 21/05/2019, às 00:19, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **KATYA NALIWAIKO, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 22/11/2019, às 16:34, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida [aqui](#) informando o código verificador **1816939** e o código CRC **1D3BACDB**.

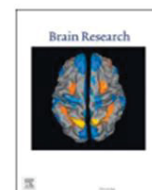
## II. ANEXO 2: ARTIGO DA TESE

Brain Research 1798 (2023) 148154



Contents lists available at ScienceDirect

Brain Research

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/brainres](http://www.elsevier.com/locate/brainres)

## Antinociceptive effect of ultra-low dose naltrexone in a pre-clinical model of postoperative orofacial pain

Wagner Hummig<sup>a</sup>, Darciane Favero Baggio<sup>a</sup>, Raphael Vieira Lopes<sup>a</sup>,  
Silmara Martins Dias dos Santos<sup>b</sup>, Luiz Eduardo Nunes Ferreira<sup>b</sup>, Juliana Geremias Chichorro<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Pharmacology, Biological Sciences Sector, Federal University of Parana, Curitiba, Parana, Brazil

<sup>b</sup> Laboratory of Inflammation and Immunology, Guarulhos University, São Paulo, Brazil

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Opioids  
Incision surgery  
Rats  
Facial hyperalgesia  
Toll-like receptor 4  
Pro-inflammatory cytokines

## ABSTRACT

Pain management after oral surgeries is essential to enhance recovery, reduce negative outcomes and improve the experience of the patient. Naltrexone (NTX) is a non-selective opioid receptor antagonist that has been shown to modulate neuro-inflammation when employed in low to ultra-low doses. In addition, ultra-low dose naltrexone (ULDN) has been shown to potentiate opioids' analgesia and to have opioid-sparing effects. Herein it was investigated the effect of ULDN in a model of postoperative orofacial pain in rats, and it was tested the hypothesis that blockade of TLR4-signalling pathway contributes to its antinociceptive effect. Systemic NTX reduced heat hyperalgesia in female rats and heat and mechanical hyperalgesia in male rats after incision surgery. Combined treatment with NTX and morphine, both at ineffective doses, resulted in a significant reduction of heat hyperalgesia in male rats. NTX injection at the incision site failed to change heat hyperalgesia, but injection at the trigeminal ganglion (TG) or subnucleus caudalis (Sp5C) caused a significant reduction in heat hyperalgesia. At these sites, blockade of TLR4 impeded NTX effect. Lipopolysaccharide (LPS) injection in the intraoral mucosa resulted in facial heat hyperalgesia an increase in IL-1 $\beta$  levels in the TG, which were reduced by systemic NTX. Stimulation of macrophages with LPS resulted in increase of nitric oxide, IL-1 $\beta$  and CXCL-2 levels which were reduced by NTX. Altogether, these results provide evidence for an antinociceptive effect of ULDN in postoperative orofacial pain and suggest that blockade of TLR4 and downstream signaling pathway contribute to its effect.