

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS NEUROTRÓFICO E NEURO INFLAMATÓRIOS
EM RATOS COM ARTRITE NA ARTICULAÇÃO TEMPOROMANDIBULAR
TRATADOS COM MELATONINA E/OU MORFINA**

Hemily Barbosa Braga

Porto Alegre
2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Hemily Barbosa Braga

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS NEUROTRÓFICO E NEURO INFLAMATÓRIOS
EM RATOS COM ARTRITE NA ARTICULAÇÃO TEMPOROMANDIBULAR
TRATADOS COM MELATONINA E/OU MORFINA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito à obtenção de título de grau de Farmacêutica.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª Iraci Lucena da Silva Torres

Co-Orientador: João Luís Souza Vargas

Porto Alegre

2024

AGRADECIMENTOS

Aos colaboradores do Laboratório de Farmacologia da Dor e Neuromodulação: Investigações Pré-Clínicas, os quais me receberam com muita hospitalidade e carinho e foram parte importante no processo de aprendizagem nesses dois anos de parceria.

À minha orientadora, Prof Dr. Iraci Torres, e ao Dr. Dirson Stein, por me darem a oportunidade de trabalhar e aprender no Laboratório, por me proporcionarem espaço e autonomia para realização deste trabalho e por me mostrarem na prática, a paixão e a força da pesquisa Brasileira.

Ao meu Co-orientador, colega, e agora amigo, João Vargas por toda ajuda para realização prática e busca por bancos de dados deste trabalho, sem sua dedicação e disponibilidade tudo seria mais difícil, obrigada pelos ensinamentos.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e Faculdade de Farmácia, pelo excelente ensino prestado, por toda assistência e vivências proporcionadas ao longo desses onze semestres.

Às colegas de curso Gabriela Lemos, Khetrüin Fiuza e Nayara Tertuliano, por deixarem tudo mais leve, pelo apoio e ajuda prestada quando me senti exausta e achei que não conseguiria, terei para sempre vocês em meu coração.

Ao meu namorado e companheiro de vida, Mateus D'Alberto pelas noites não dormidas me ajudando a estudar, por me desafiar a ser melhor, por todo o apoio, colo, carinho, atenção, e encorajamento quando pensei em desistir. Te amo, obrigada!

Agradeço a mim mesma, por tamanha vontade e perseverança, coragem de sair da casa da mãe e vir enfrentar a vida em busca do meu sonho.

Por fim, à minha mãe, Lucimere Amélia Barbosa, que sozinha, criou a mim e meus quatro irmãos, com muita dedicação e empenho, me incentivando a sempre manter e lutar pelos meus sonhos, fostes, por muitas vezes, minha maior inspiração e para sempre serás minha base. Te amo, obrigada!

De modo geral, obrigada a todos que, mesmo que por pouco tempo, passaram pela minha vida e deixaram sua marca, me ensinaram a reconhecer o valor dos pequenos momentos.

Muito obrigada!

São as nossas escolhas que revelam o que realmente somos,
muito mais do que as nossas qualidades.

“Alvo Dumbledore”
(ROWLING. J.K., Harry Potter e a Câmara Secreta).

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	6
LISTA DE TABELAS.....	7
LISTA DE ABREVIATURAS.....	8
RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. OBJETIVOS.....	14
2.1. Objetivo geral.....	14
2.2. Objetivos específicos.....	14
3. METODOLOGIA.....	15
3.1. Animais.....	15
3.2. Fármacos e Produtos Químicos.....	15
3.3. Desenho experimental.....	16
3.4. Modelo de artrite da articulação temporomandibular (AAT).....	17
3.5. Tratamentos farmacológicos.....	18
3.6. Eutanásia.....	18
3.7. Coleta de tecidos e processamento das amostras.....	19
3.8. Dosagem de Proteínas.....	19
3.9. Marcadores Bioquímicos.....	19
3.10. Histologia da ATM.....	20
3.11 Aspectos éticos.....	20
3.12 Análises estatísticas.....	21
4. RESULTADOS.....	22
5. DISCUSSÃO.....	26
6. CONCLUSÕES.....	29

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Linha temporal do estudo.....	17
FIGURA 2. Imagem histológica representativa dos grupos (coloração HE).....	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Marcadores neuroinflamatórios (TNF- α e IL-10) e neurotrófico (BDNF) nas estruturas córtex, medula espinhal e tronco encefálico.....	23
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AAT - Artrite da articulação temporomandibular

AMPC - Adenosina cíclica 3', 5'-monofosfato

ATM - Articulação temporomandibular

BDNF - Fator neurotrófico derivado do cérebro

CFA - Adjuvante Completo de Freund (do inglês *Adjuvant, Complete Freund*)

DTM - Disfunção temporomandibular

ELISA - Ensaio imunoabsorvente ligado a enzima (do inglês *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*)

HE - Coloração hematoxilina-eosina

HIO - Hiperalgia induzida por opioide (HIO)

IL-10 - Interleucina 10

IFN-gama - Interferon gama

I.P. - Intraperitoneal

M - Morfina

Mel - Melatonina

NMDA - receptores "N-Metil-D-aspartato"

PKC - Proteína quinase C

PKC γ - Proteína quinase C γ

RVM - medula ventromedial rostral (do inglês *Rostral Ventromedial Medulla*)

S.C. - Subcutâneo

SNC - Sistema nervoso central

TNF- α - Fator alfa de necrose tumoral

V₁ - Veículo de morfina (salina 0,9%)

V₂ - Veículo de Melatonina (propilenoglicol 40%)

RESUMO

Os fármacos opioides são potentes analgésicos amplamente utilizados a nível ambulatorial e hospitalar no alívio da dor aguda e crônica. Esta classe de fármacos está relacionada a importantes efeitos adversos, incluindo letargia, dependência e aumento paradoxal da dor (hiperalgesia induzida por opioide, HIO). O tratamento atual da HIO realizado com fármacos anti-inflamatórios é insatisfatório, e pesquisas atuais buscam novas terapias no manejo da dor, como a melatonina. Nesse cenário, este trabalho teve como objetivo principal investigar o efeito da administração repetida de morfina e/ou melatonina em parâmetros neurotrófico e neuroinflamatórios em ratos condicionados a um modelo de artrite da articulação temporomandibular (AAT). Ao total 73 ratos Wistar (65 dias; n=8/9 por grupos) foram randomizados e divididos (D0) conforme injeção intra-articular na articulação temporomandibular (ATM): em grupos SHAM, com infiltração de salina 0,9%, e grupos DOR, com infiltração de Complexo Adjuvante de Freund (CFA) não diluído. Após quatorze dias (D14), iniciou-se o tratamento diário com melatonina (50 mg/kg, por via intraperitoneal) e/ou morfina (5 mg/kg, por via subcutânea), pelo período de 8 dias. Ao final do protocolo experimental (D23), realizou-se a eutanásia dos animais e quantificou-se a concentração de proteínas, o marcador neurotrófico (fator neurotrófico derivado do encéfalo, BDNF) e marcadores inflamatórios fator alfa de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina-10 (IL-10) em amostras de córtex total, medula espinhal e tronco encefálico. Paralelamente, foram confeccionadas lâminas histológicas e fotografias representativas da ATM dos grupos. Os resultados do estudo demonstram a efetividade do modelo de AAT, visto que os grupos DOR apresentaram acúmulo de CFA e evidente inflamação tecidual. Associado a isto, o modelo de AAT aumentou significativamente os níveis de TNF- α e IL-10 em tronco encefálico. Por outro lado, o tratamento com melatonina induziu uma diminuição significativa nos níveis de BDNF na mesma estrutura. Por fim, o grupo DOR tratado isoladamente com a melatonina apresentou redução na inflamação tecidual na ATM e este efeito não foi observado quando a melatonina foi associada à morfina. Estes resultados evidenciam a aplicação do CFA como modelo indutor confiável de AAT e apontam o potencial da melatonina como um possível adjuvante no tratamento de processos inflamatórios orofaciais.

PALAVRAS-CHAVE: Melatonina, Morfina, Dor Crônica Inflamatória, Articulação Temporomandibular (ATM), Artrite da ATM (AAT), Ratos Wistar.

ABSTRACT

Opioids are potent analgesics widely used at hospitals or clinical centers to treat acute and chronic pain. This pharmaceutical group is related to critical adverse effects, such as lethargy, dependency and paradoxical pain (opioid-induced hyperalgesia, OIH). The current OIH and pain treatment using anti-inflammatory drugs is unsatisfactory and researchers aim for more efficient pain management therapies, such as melatonin. In this scenario, this study had the main goal to investigate the effect of repeated melatonin/morphine injections treatment on neurotrophic and neuroinflammatory markers on rats conditioned to a temporomandibular articulation (TMA) arthritis model (TAA). In total, 73 Wistar rats (65 days old; n=8/9 each group) were randomly divided (D0) according to temporomandibular injections: SHAM groups, 0,9% saline infiltration and PAIN groups, injected with undiluted Adjuvant Complete Freund (CFA). After 14 days (D14), rats were treated daily with melatonin (50 mg/kg, intraperitoneally) and/or morphine (5 mg/kg, subcutaneous) during an 8 days period. At the end of protocol experimentation (D23), euthanasia was conducted and followed by quantification of proteins, neurotrophic BDNF marker, TNF- α and IL-10 inflammation markers in the cortex, spinal cord and encephalic steam. In parallel, ATM was dissected, stained and analyzed using histological microscopy/photography. Our results demonstrate the efficiency of the used TAA model, given the CFA accumulation and tissue inflammation found in the PAIN groups. Associated to this finding, AAT model significantly increased TNF- α and IL-10 levels on the encephalic steam. On the other hand, melatonin treatment significantly diminished BDNF maker on the same brain structure. Finally, the DOR group treated with melatonin alone showed a reduction in tissue inflammation in the TMJ and this effect was not observed when melatonin was associated with morphine.. These results enlight the CFA injection as a reliable TAA induction model and point to the potential use of melatonin as an adjuvant treatment to orofacial inflammatory conditions

KEYWORDS: Melatonin, Morphine, Chronic Inflammatory Pain, Temporomandibular Articulation (TMA), Temporomandibular Articulation Arthritis (TAA), Wistar rats.

1. INTRODUÇÃO

Os fármacos opioides são potentes analgésicos amplamente utilizados no alívio da dor aguda e crônica, em nível ambulatorial e hospitalar, e estão relacionados a importantes efeitos adversos, incluindo tolerância e a indução paradoxal de hiperalgesia (ROECKEL *et al.*, 2017). O desenvolvimento da tolerância é caracterizado pela diminuição do efeito analgésico ao longo do tempo com determinada dose do opioide, ou seja, ocorre um desvio negativo da curva dose-resposta (FIELDS, 2011). Por outro lado, a hiperalgesia induzida por opioide (HIO), considerada como uma hiperalgesia secundária, requer tempo e dosagens progressivamente mais altas para sua manifestação, sendo expressa como uma maior sensibilidade à dor e tolerância farmacológica. Este fenômeno é observado principalmente quando a morfina é rapidamente descontinuada após tratamento prolongado (BAHRAMI *et al.*, 2018).

Os processos nociceptivos e neuroquímicos subjacentes à tolerância a opioides e a HIO não são claramente compreendidos (ZHAO *et al.*, 2012), e também não há um tratamento específico para esses efeitos adversos (JOSEPH *et al.*, 2000). No entanto, sugere-se que a dessensibilização dos receptores opioides é o principal fator no desenvolvimento da tolerância a esta classe de fármacos (WILLIAMS *et al.*, 2013). Corroborando esta hipótese, a proteína quinase $C\gamma$ (PKC γ), variante primária da família da proteína quinase C (PKC), presente na medula espinhal, tem função vital na dessensibilização dos receptores opioides (SONG *et al.*, 2015).

Além disso, a administração repetida de morfina leva à ativação da PKC em astrócitos reativos localizados no corno dorsal da medula espinhal (NARITA *et al.*, 2008). Por outro lado, Hemati e colaboradores (2020) reportam que substâncias anti-inflamatórias e antioxidantes, como a melatonina, podem reduzir o desenvolvimento de tolerância e dependência física causada pela morfina, onde a injeção simultânea de melatonina suprime o aumento na expressão de PKC γ induzido pelo uso prolongado de morfina (Song *et al.*, 2015).

A melatonina, um hormônio sintetizado pela glândula pineal, é capaz de minimizar a atividade de receptores NMDA e a ativação de genes associados à tolerância à morfina (HOSSEINZADEH *et al.*, 2019). No estudo realizado por Wang e colaboradores (2012), a administração de melatonina em ratos, por via sistêmica ou intratecal, tem efeito analgésico dose-dependente. Além disso, achados atuais apontam que a melatonina é capaz de neutralizar o aumento da sensibilidade à dor induzida pela morfina, mitigando a HIO (FAN *et al.*, 2017). Estes efeitos podem ser causados pela sua capacidade de inibir a ativação microglial na medula espinhal de ratos, diminuindo assim a atividade da PKC, inibindo

receptores do tipo NMDA e aumentando os níveis da adenosina-monofosfato cíclica (AMPC) (WANG *et al.*, 2012, FAN *et al.*, 2017). Outro estudo pré-clínico demonstrou que a melatonina reduziu a abstinência à morfina induzida pela administração de naloxona, possivelmente por aumentar os níveis de β -endorfina na substância cinzenta do mesencéfalo e diminuir da mesma no núcleo arqueado hipotalâmico dos ratos (WEI *et al.*, 2007). Assim, considerando o aspecto translacional, estes estudos sugerem a melatonina como uma opção viável na prevenção e tratamento da tolerância e HIO.

A dor é uma experiência sensorial e multifatorial desagradável que está associada ou relacionada a uma lesão real ou potencial dos tecidos (RAJA *et al.*, 2020), sendo um processo complexo que depende de vários mecanismos a nível periférico e central. Lesões periféricas englobam mudanças na excitabilidade periférica, no gânglio da raiz dorsal, em neurônios da medula espinhal, nos sistemas descendentes inibitórios e alterações na neuroplasticidade cortical (BARON *et al.*, 2010). Enquanto os processos periféricos incluem descargas ectópicas e espontâneas, alterações em canais iônicos, em neurônios aferentes primários, em neurônios simpáticos no gânglio da raiz dorsal e sensibilização dos nociceptores, os processos centrais são relacionados à sensibilização central com alterações em neurotransmissores, neuromoduladores, receptores e canais iônicos (SU *et al.*, 2014).

Dentro desse cenário, o sistema imunológico tem um papel crítico no desenvolvimento e na manutenção da dor crônica: as citocinas pró-inflamatórias, como as interleucinas IL-1, IL-6 e o TNF- α , e anti-inflamatórias, como IL-10, têm funções arbitrárias no estabelecimento duradouro das condições de dor (TOTSCH & SORGE, 2017). Assim, as condições crônicas de dor são resultados de processos mal adaptativos nas vias nociceptivas, que perpetuam e modulam processos centrais de sensibilização (WU *et al.*, 2016). Além disso, as neurotrofinas desempenham importante papel ao modular a neuroplasticidade central e periférica, atuando na sobrevivência, crescimento, diferenciação e reparo de neurônios (KRAYCHETE *et al.*, 2006). Mais especificamente, o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) é amplamente distribuído no sistema nervoso central e está envolvido em processos de aprendizado, memória e plasticidade sináptica. Apesar do BDNF estabelecer uma relação complexa e multifatorial com doenças inflamatórias, estima-se que a inflamação crônica contribui para a redução dos níveis de BDNF, o que, por sua vez, aumenta a vulnerabilidade do sistema nervoso central (SNC) a danos e contribui para o desenvolvimento de diversas doenças (SCARABELOT *et al.*, 2019). Por este motivo, estima-se que o BDNF é um importante alvo para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.

Dentro do conjunto das dores crônicas, as síndromes de dor orofacial consistem-se em

condições clinicamente reconhecidas e classificadas como neuropatias cranianas dolorosas, e outras dores faciais na Classificação Internacional de Dores de Cabeça (ZUNINGA-ROMERO *et al.*, 2014). A dor orofacial tem origem complexa e multifatorial e o direcionamento terapêutico varia conforme a causa (SBDDOF, 2020). Mais especificamente, as disfunções temporomandibulares (DTMs), chamadas de disfunções musculares e da articulação temporomandibular, são caracterizadas por dores e alterações na articulação da mandíbula, músculos e tecidos de suporte (National Institute of Dental and Craniofacial Research, 2020). A articulação temporomandibular (ATM) também pode ser afetada na artrite reumatoide, uma condição autoimune que resulta em degeneração inflamatória da articulação acometida (TANAKA *et al.*, 2008). O tratamento da dor orofacial é um processo individualizado e contínuo, que requer acompanhamento profissional e a colaboração do paciente (SBED, 2021). Por meio de um diagnóstico preciso, medidas terapêuticas adequadas e mudanças no estilo de vida, a dor orofacial pode ser controlada, permitindo desfrutar de uma vida plena e livre de sofrimento (SBN, 2018).

A avaliação da dor orofacial em humanos é complexa e ainda existem lacunas de conhecimento nesta área. Nesse contexto, o emprego de modelos animais de dor orofacial possibilita investigar essas lacunas, como explorar em profundidade a fisiopatologia dos transtornos de origem craniofacial (SIQUEIRA-LIMA *et al.*, 2017), assim como de novas terapias farmacológicas, avaliando a sua eficácia, segurança e alterações de parâmetros neuroquímicos e moleculares associados. O modelo de artrite em ratos induzido pela administração de Adjuvante Completo de Freund (CFA) é bem caracterizado na literatura e é rotineiramente empregado para busca de novos fármacos para o tratamento da dor inflamatória, incluindo a osteoartrite. A administração de CFA na ATM tem sido utilizada como um modelo de dor orofacial inflamatória crônica (VICENZI *et al.*, 2022).

Considerando a escassez ou inexistência de estudos pré-clínicos que explorem o efeito da melatonina sobre a HIO em modelos de dor crônica orofacial, torna-se essencial a realização de estudos que avaliem o impacto da melatonina nas respostas nociceptiva e neuroquímica de animais, buscando novas opções terapêuticas que previnam a HIO.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Investigar o efeito da administração diária da melatonina, separada ou associada à morfina, sobre a estrutura tecidual, marcadores neurotróficos e neuroinflamatórios, em ratos submetidos a um modelo de artrite da articulação temporomandibular (AAT) induzida por CFA.

2.2. Objetivos específicos

- a) Analisar a resposta neuroinflamatória por meio da avaliação dos níveis de TNF- α e IL-10 em córtex cerebral, medula espinhal e tronco encefálico;
- b) Analisar a resposta neurotrófica por meio da avaliação dos níveis de BDNF em córtex cerebral, medula espinhal e tronco encefálico;
- c) Avaliar perfil histológico da articulação temporomandibular em animais com ou sem modelo de AAT.

3. METODOLOGIA

3.1. Animais

Neste estudo foram utilizados 73 ratos Wistar provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL®), do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS®), com 65 dias de idade, pesando 200 - 250g no início do experimento. Os animais foram mantidos na Unidade de Experimentação Animal (UEA®) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA®), alojados em grupos de três em gaiolas microisoladoras (49×34×16 cm) com piso coberto de maravalha, em ambiente controlado com ciclo claro-escuro de 12 horas, temperatura ambiente (22°C ± 2°C), com livre acesso à água e ração (Nuvilab CR1, Nuvital®). As gaiolas foram enriquecidas ambientalmente com pedaços de madeira, cordas, rolos de papelão e papel picado. Todos os experimentos e procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da instituição (protocolo GPPG-HCPA nº2020-0689) e estavam em conformidade com as diretrizes brasileiras para o uso de animais em pesquisa (Lei nº 11.794). Cabe ressaltar que os animais foram monitorados quanto a composição corporal (perda ou ganho de peso), mobilidade (letargia ou ataxia), postura (incapacidade de permanecer em pé ou arqueamento do dorso), alteração na frequência e no padrão respiratório, coloração de mucosas (cianose e palidez), grau de hidratação (aumento do tempo de pregueamento da pele, enoftalmia e oligúria), e perfil de alimentação (anorexia). Caso o animal apresentasse perda de peso superior a 10% (na primeira semana) ou 15% (até o final do protocolo experimental) ou outras alterações clínicas não possíveis de reverção ou minimização com manejo, analgésicos e/ou fluidoterapia, a antecipação da eutanásia era prevista.

3.2. Fármacos e Produtos Químicos

O Adjuvante Completo de Freund [CFA®, espécie de *Mycobacterium tuberculosis* inativadas por calor intenso, tendo concentração 1 mg/mL] foi adquirido do fabricante Sigma-Aldrich® (cat #5881, St. Louis, MO, EUA). A solução salina (NaCl 0,9%) foi utilizada como diluente e aplicada por infiltração intra-articular no grupo SHAM. A morfina (M) foi diluída em salina 0,9% até atingir uma solução de 5 mg/kg e ser administrada por via subcutânea (s.c.) (TORRES *et al.*, 2003; ROZISKY *et al.*, 2008; HESTEHAVE *et al.*, 2019; MAI *et al.*, 2020). A melatonina (Mel) foi diluída em propilenoglicol a 40% e completada com solução salina para produzir uma solução de concentração final de 50 mg/kg: a solução foi pré-aquecida para maximizar a solubilidade antes da injeção intraperitoneal (i.p.) (LASTE

et al, 2012, SCARABELOT *et al*, 2016).

3.3. Desenho experimental

Os ratos foram mantidos em período de habituação por 14 dias após sua chegada ao alojamento da UEA. Primeiramente (dia 0, D0), os ratos foram randomizados por peso e pelo limiar nociceptivo facial basal (teste de Von Frey eletrônico, dado não apresentado), e divididos em dois grupos maiores: (1) grupo SHAM (n = 36/grupo), o qual recebeu solução salina 0,9% na ATM; (2) grupo DOR (n = 37/grupo), que recebeu CFA (1 mg/mL) na ATM direita. No 13º dia (D13), o estabelecimento do modelo AAT foi avaliado por meio do teste de von Frey e este teste foi repetido nos dias 13, 14, 15, 21 e 22 (dados não apresentados). No 14º dia após a indução do modelo, iniciou-se o tratamento diário por 8 dias com M e/ou Mel por via subcutânea (s.c, 5 mg/kg.) e via intraperitoneal (i.p., 50 mg/kg), respectivamente. Todos os pesquisadores permaneceram sem conhecimento da divisão final dos grupos, estudo duplo-cego, com exceção do autor responsável. Ao total, os grupos experimentais foram definidos em:

- 1) Grupo SHAM + Veículo 1 + Veículo 2: SV₁V₂;
- 2) Grupo SHAM + Veículo 1 + Melatonina: SV₁Mel;
- 3) Grupo SHAM + Morfina + Veículo 2: SMV₂;
- 4) Grupo SHAM + Morfina + Melatonina: SMMel;
- 5) Grupo DOR + Veículo 1 + Veículo 2: DV₁V₂;
- 6) Grupo DOR + Veículo 1 + Melatonina: DV₁Mel;
- 7) Grupo DOR + Morfina + Veículo 2: DMV₂;
- 8) Grupo DOR + Morfina + Melatonina: DMMel.

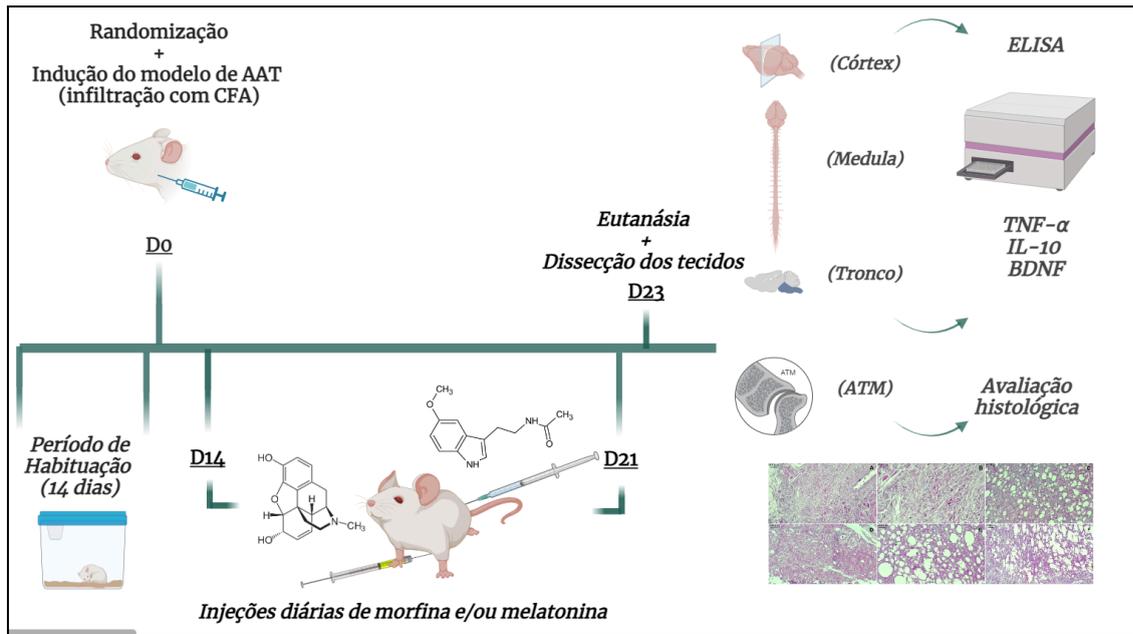


Figura 1. Linha temporal do estudo. A figura acima retrata a linha de tempo entre o período de habituação (14 dias), início do protocolo (D0, dia zero) e eutanásia dos animais (D23, dia vinte e três). Entre os dias quatorze (D14) e vinte e um (D21) a intervenção farmacológica diária com injeções de morfina e/ou melatonina foi administrada. Ao lado direito, a imagem destaca as amostras dissecadas (ATM, córtex, medula espinhal e tronco) e a destinação experimental das mesmas. ATM = articulação temporomandibular. AAT = artrite na articulação temporomandibular. CFA = Adjuvante Completo de Freund. ELISA = ensaio de imunoadsorção enzimática. TNF- α = fator alfa de necrose tumoral. IL-10 = interleucina 10. BDNF = fator neurotrófico derivado do cérebro.

3.4. Modelo de artrite da articulação temporomandibular (AAT)

Neste estudo experimental, a dor crônica inflamatória orofacial em modelo de artrite da ATM foi induzida nos ratos por meio da administração de CFA (1 μ g/ μ l) na dose de 50 μ g/50 μ l (sem diluição), injetados por infiltração via intra-articular na ATM direita do animal, sendo este um modelo de dor orofacial padronizado e descrito na literatura (WANG *et al.*, 2017; ROBIN, 2017). A identificação do sítio de injeção na ATM foi realizada pelo método descrito por Fuentes *et al.* (2017). A agulha foi inserida com 7 mm de profundidade até atingir o côndilo da ATM, que serviu de referência, acima da qual, com cerca de 3 mm, foi possível acessar o compartimento da ATM localizado acima do disco articular. Os pontos anatômicos essenciais para a realização desse procedimento estão localizados 5 mm atrás do arco zigomático e 5 mm anteriores à orelha externa, onde o processo condilar da articulação está localizado em profundidade, acima do qual é possível acessar o compartimento localizado acima da orelha sobre o disco articular.

Os grupos SHAM receberam injeção e infiltração na ATM com 50 μ l de solução salina estéril 0.9%. Para as infiltrações intra-articulares, todos os animais foram previamente anestesiados com isoflurano (indução 5% - SMITH, 1993; manutenção 2,5% - VAILLANCOURT *et al.*, 1999; WOOD *et al.*, 2001). A injeção de CFA/salina foi um

procedimento rápido, com duração total de aproximadamente 5 minutos, onde não foi preciso prolongar o período de anestesia, mitigando vieses e riscos do procedimento. A frequência respiratória foi monitorada durante a anestesia e, assim que o procedimento foi finalizado, o animal foi retirado da inalação de isoflurano e colocado em observação até a completa recuperação. Para o alívio da dor derivada do procedimento, no dia da indução do modelo com CFA e nos 2 dias subsequentes, os animais foram tratados com Tramadol (20 mg/kg/i.p, diluído em 8 mL de solução salina) em intervalos de 12 horas (GUZMAN-SILVA *et al.*, 2008).

3.5. Tratamentos farmacológicos

A dor crônica inflamatória é estabelecida 14 dias após a injeção de CFA (SCARABELOT *et al.*, 2016). Para tanto, os tratamentos farmacológicos iniciaram no décimo quarto dia de indução do modelo de dor. Os animais receberam diariamente uma administração de salina, morfina e/ou melatonina. A melatonina foi administrada por via i.p. na dose de 50 mg/kg (LASTE *et al.*, 2012; ROZISKY *et al.*, 2016; SCARABELOT *et al.*, 2016). Primeiramente, a melatonina foi diluída em propilenoglicol (40%) usando como transporte salina (NaCl, 0,9%), formando uma solução final de 50 mg/ml. Essa solução foi aquecida em banho-maria a 54°C para homogeneização. Após aspiração da dose em seringa individual, aguardou-se 2 minutos para resfriamento da solução e posterior administração. A dose utilizada de morfina foi de 5 mg/kg diluída em solução salina e administrada por via s.c. (TORRES *et al.*, 2003; ROZISKY *et al.*, 2008; HESTEHAVE *et al.*, 2019; MAI *et al.*, 2020). Ambos os fármacos foram administrados uma vez ao dia por 8 dias consecutivos. Os veículos utilizados foram, solução salina para o controle da morfina (V₁) e propilenoglicol 40% + solução salina 60% (V₂) para o controle da melatonina.

3.6. Eutanásia

Os animais foram eutanasiados por decapitação sem uso de anestésico, 24 horas após a última avaliação do teste comportamental. É importante salientar que o modelo previa a verificação dos efeitos neuroquímicos e dosagens bioquímicas que poderiam ser alteradas pela utilização de anestesia durante a morte dos animais (BICKLER & FAHLMAN, 2006). Qualquer que fosse o fármaco utilizado para a morte, afetaria a fisiologia do animal de alguma maneira. Os barbitúricos, anestésicos gerais mais utilizados, são potentes hipnóticos, que produzem depressão dose-dependente do SNC. Devido ao objetivo do trabalho, que previu a preservação da fisiologia do cérebro para posterior análise, a eutanásia por

guilhotinamento se fez necessária (BICKLER & FAHLMAN, 2006). Além disso, estudos já demonstraram que a decapitação causa inconsciência rápida e indolor (HOLSON, 1992; VAN RIJN *et al.*, 2011). Os pesquisadores do grupo têm experiência nesta forma de eutanásia e foi utilizado equipamento específico para esse fim, obedecendo as Diretrizes da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), conforme a RN 37/2018.

3.7. Coleta de tecidos e processamento das amostras

Após a eutanásia, foram coletados a medula espinhal, tronco encefálico e córtex cerebral total, que foram posteriormente homogeneizadas com tampão PBS 1% (pó, pH 7,2 frasco contendo 10g - *LB Laborclin*) diluído em 1L de água destilada juntamente com coquetel inibidor de proteases (*protease inhibitor cocktail*, Sigma-Aldrich®) em homogeneizador automático (Ultra Stirrer 500®) durante 30 segundos. Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 5000 rpm durante 15 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante (aproximadamente 400 uL) foi retirado, dividido e transferido em volumes equivalentes para microtubos de 1 mL. As amostras de ATM foram coletadas para realização de avaliação histológica (3.10). As estruturas coletadas foram armazenadas em tubos microtubos de 0,5 e 1ml e estão mantidas em ultra-freezer a -80°C até o momento da análise.

3.8. Dosagem de Proteínas

A proteína total dos homogenatos foi dosada pelo método colorimétrico Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando-se da albumina sérica bovina em diferentes concentrações (0,05 a 0,8 mg/mL) para montagem de curvas padrões para cada estrutura/placa. As equações estimadas foram $y = 0,153.x + 0,208$ com $R^2 = 0,921$, $y = 0,15.x + 0,22$ com $R^2 = 0,908$ e $y = 0,155.x + 0,214$ com $R^2 = 0,91$, para os marcadores córtex total, medula espinhal e tronco encefálico, respectivamente. A densidade óptica das amostras foi quantificada em duplicatas, em dias distintos, no leitor de microplacas Spectramax M3® (comprimento de onda de 490 nm). O valor obtido das proteínas de soro (mg) por animal é necessário como denominador de correção para confecção dos resultados.

3.9. Marcadores Bioquímicos

As análises do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 10 (IL-10) foram realizadas usando kits de ensaio de

imunoadsorção enzimática (ELISA), disponível comercialmente para ratos . Os experimentos foram realizados seguindo as instruções do fabricante (R&D Systems®, Minneapolis, MN, EUA). A densidade óptica foi mensurada usando o leitor de microplacas Spectramax M3® (comprimento de onda de 450 nm). Os valores de densidades ópticas foram gravados e levados ao site MyAssay®, a fim de gerar a curva padrão da corrida e identificar o valor (em pg) dos marcadores bioquímicos supracitados (teste “*Four Parameters Logistic Curve*”). Os dados dos marcadores bioquímicos foram expressos em pg/mg de proteína.

3.10. Histologia da ATM

Para confecção de lâminas histológicas, as regiões periarticular e articular foram removidas, acondicionadas e fixadas em formol 10%. Em seguida, as amostras foram embutidas em parafina, e os blocos resultantes foram cortados em fatias de 5 µm de espessura. Após, os cortes foram montados em lâminas histológicas, desparafinizados por meio ácido e hidratados, seguido da coloração pela técnica de hematoxilina-eosina (HE) (PROPHET *et al.*, 1992). Os cortes foram lavados para remoção do excesso de corante e na sequência analisados e fotografados em microscopia óptica (objetivas de 100 e 200x), a fim de identificar perfil de inflamação, distribuição celular e formação de tecido fibroso. As imagens histológicas das lâminas dos grupos SV1V2, DV1V2, DV1Me1, DMV2 e DMMel foram avaliadas visualmente por pesquisador externo experiente e classificadas conforme a morfologia estrutural, padrão de coloração e infiltração de células mononucleares no tecido e tecidos periféricos (score inflamatório = 0, células mononucleares ausentes; score inflamatório = 1, presença modesta de células mononucleares [1–10% das células]; score inflamatório = 2, presença moderada de células mononucleares [11–50% das células]; e score inflamatório = 3, presença exacerbada de células mononucleares [51-100% das células]) (LASTE *et al.*, 2013).

3.11 Aspectos éticos

Os procedimentos propostos por esse projeto obedeceram aos Princípios Internacionais Orientadores para a Pesquisa Envolvendo Animais. Da mesma forma, foram seguidas as recomendações da Lei n. 11794/08 de Procedimentos para o Uso Científico de Animais (Lei AROUCA). Foram utilizados métodos de enriquecimento ambiental padronizados pela UEA, como folhas de papel, rolos de papel, tubo de PVC e sementes de girassol. Os itens foram oferecidos de forma alternada e as substituições são feitas nos momentos de troca das caixas. Assim como todos os procedimentos foram realizados de

acordo com as Resoluções Normativas nº 30 e nº 33 do CONCEA. O procedimento de morte dos animais seguiu as Diretrizes da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA, (Resolução Normativa nº 37, 2018). O presente projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do HCPA (GPPG-HCPA nº2020-0689) e somente foi executado após a sua aprovação.

3.12 Análises estatísticas

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa estatístico SPSS® (Statistical Package for the Social Science), versão 18.0. Inicialmente, os dados foram submetidos a uma análise de homogeneidade por teste de Shapiro-Wilk, a fim de determinar a análise estatística a ser realizada. Após avaliação da normalidade, os valores outliers (equivalentes à $2 \pm$ Erro Padrão, sendo no máximo dois casos por grupo) foram substituídos pelo valor limite no intervalo (HUSSAIN ADIL e UR REHMAN IRSHAD, 2015). Os dados paramétricos dos biomarcadores foram analisados por ANOVA de três vias, seguida pelo *post-hoc* de Student-Newman-Keuls (SNK). Já para os dados não paramétricos foi-se utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste *post hoc* de Dunn's. Os dados tabulares foram expressos em média \pm Erro Padrão da média (EP) ou mediana [intervalo interquartilício - IQR], sendo as diferenças consideradas estatisticamente significativas quando $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

Os níveis do marcador inflamatório TNF- α no tronco encefálico foram significativamente maiores nos ratos infiltrados com CFA (DV₁V₂, 52,02 \pm 17,42 pg/mg de proteína) se comparados ao grupo infiltrado com salina (SV₁V₂, 42,07 \pm 7,34 pg/mg) [ANOVA de 3 vias, F (7, 65) = 7,395, p = 0,08]. Entretanto, este aumento induzido pelo CFA não se repetiu no córtex [Kruskal-Wallis, p=0,560] nem na medula espinhal dos animais, apesar desta última estrutura apresentar nítida marginalidade estatística [ANOVA 3 vias, F (7, 65)=3,553, p = 0,064]. Além disso, os níveis de TNF- α nos tecidos não foram significativamente afetados pela intervenção com morfina [ANOVA 3 vias, F (7, 65) = 3,406, p = 0,70,] ou melatonina (ANOVA 3 vias, F (7,65) = 1,751, p = 0,190), ou sua combinação [ANOVA 3 vias, F (7, 67) = 0,217, p = 0,643] no modelo de AAT.

Os níveis do marcador anti-inflamatório IL-10 no tronco cerebral também foram significativamente maiores nos ratos em modelo de AAT (DV₁V₂, 8,82 \pm 1,49 pg/mg de proteína) se comparados aos ratos SHAM (SV₁V₂, 7,89 \pm 0,89 pg/mg de proteína) [ANOVA 3 vias, F (7, 65) = 4,828, p = 0,032]. Não foram observadas diferenças significativas nos níveis de IL-10 na medula espinhal entre os grupos infiltrados com salina (SV₁V₂, 2,85 \pm 0,544 pg/mg de proteína) e tratados com melatonina (SV₁Mel 3,60 \pm 0,93 pg/mg de proteína) [ANOVA 3 vias, F (7, 65) = 3,035, p = 0,086]. Da mesma forma, não houve diferença significativa nos grupos com a presença de CFA (DV₁Mel, 3,50 \pm 0,48 pg/mg de proteína) ou não (SV₁V₂, 2,85 \pm 0,544 pg/mg de proteína) com melatonina [ANOVA 3 vias, F (7, 65) = 2,851, p = 0,096]. Os níveis de IL-10 no córtex cerebral não foram influenciados por nenhuma das intervenções [ANOVA 3 vias, F (7, 65) = 0,282, p = 0,597].

Por outro lado, houve uma diminuição significativa nos níveis de BDNF no tronco encefálico no grupo tratado com melatonina (DV₁Mel, 12,72 \pm 2,82 pg/mg proteínas) em relação aos animais tratados com veículo (DV₁V₂, 14,81 \pm 2,94 pg/mg de proteína) [ANOVA 3 vias, F (7, 65) = 5,112, p = 0,027]. Não foi registrada alteração induzida por melatonina nos níveis de BDNF na medula espinhal (SV₁Mel, 7,42 \pm 1,42 pg/mg de proteína vs. SV₁V₂, 6,43 \pm 1,42) [ANOVA 3 vias, F (7, 65) = p = 0,172]. Também não foram observadas diferenças entre os grupos em relação ao modelo e tratamentos farmacológicos nos níveis de BDNF no córtex cerebral (Kruskal-Wallis, p = 0,994).

A seguir, os dados supracitados dos marcadores é representado na Tabela 1:

Tabela 1. Marcadores neuroinflamatórios e neurotróficos (TNF- α , IL-10 e BDNF) nas estruturas córtex, medula espinhal e tronco.

	TNF α			IL-10			BDNF		
	Córtex (n=70)	Medula (n=73)	Tronco (n=73)	Córtex (n=73)	Medula (n=73)	Tronco (n=73)	Córtex (n=73)	Medula (n=73)	Tronco (n=73)
SV ₁ V ₂	7,16±2,76	2,78±0,87	42,07±7,34	1,50±0,53	2,85±0,54	7,89±0,89	2,99±0,96	6,43±1,42	12,82±1,77
SV ₁ Mel	6,65±1,67	3,66±1,37	35,03±13,26	1,35±0,49	3,60±0,93	6,74±1,77	2,93±0,98	7,42±1,42	11,72±2,08 ^b
SMV ₂	6,96±3,01	2,34±0,89	42,57±13,12	1,50±0,67	3,11±0,90	6,89±1,41	3,06±0,86	6,94±1,54	12,90±3,28
SMMel	7,89 ±3,67	2,84±1,63	39,42±4,22	1,64±1,10	3,77±0,33	7,64±1,40	3,22±1,48	7,42 ±0,95	12,41±2,88 ^b
DV ₁ V ₂	7,19±2,99	3,63±1,60	52,02±17,42 ^a	1,50±0,87	3,77±0,96	8,82±1,49 ^a	3,01±1,24	7,63±1,01	14,81±2,94
DV ₁ Mel	7,11±2,99	3,04±1,51	54,41±18,25 ^a	1,64±0,67	3,50±0,48	8,04±1,41 ^a	2,92±1,17	7,45±0,95	12,72±2,82 ^b
DMV ₂	8,62±3,42	4,34±1,84	52,04±24,66 ^a	1,77±0,95	3,50±1,22	7,84±2,61 ^a	3,37±1,38	7,46±1,69	13,56±4,16
DMMel	5,53 [3,76-5,96]	4,11±1,64	41,65±15,98 ^a	1,65±0,27	3,74±1,33	7,73±1,67 ^a	2,67 [1,45-2,94]	7,65±1,14	11,91±1,36 ^b

Os valores tabelados em pg/mg de proteínas são representados por mediana [IQR] (TNF- α e BDNF da estrutura Córtex) ou média \pm Erro Padrão (demais análises). Todos os marcadores/estruturas possuem n=73, com exceção do TNF- α córtex (n=70). Ao total, utilizou-se n=8-9/ratos para os oito grupos. ^a= efeito CFA (p<0,05) em comparativo ao grupo SHAM; ^b= efeito tratamento Melatonina (p<0,05) em comparativo aos grupos veículos ou/e morfina.

Considerando a avaliação visual representativa das lâminas histológicas (Figura 2), com estruturas montadas e cortadas em blocos de parafina e coradas por Hematoxilina-eosina (HE), é possível visualizar algumas alterações na ATM induzidas pelo modelo de AAT e/ou presença da melatonina. A figura 2.B (grupo SV_1V_2) apresenta estrutura morfológica preservada e normocorada, sem características de padrão inflamatório na ATM (ausência de reação inflamatória, score inflamatório = 0). O mesmo não acontece para o grupo DV_1V_2 (figura 2.C), onde percebe-se o distinto perfil morfológico, com grosseiros acúmulos de CFA no tecido e acentuamento da coloração de eosina/espécies ácidas (reação inflamatória intensa, score inflamatório = 3), e também apresenta difusa presença de células imunes mononucleares adjacentes (possivelmente linfócitos e monócitos). Apesar de não tão abundantes em células imunológicas, as estruturas da ATM no tratamento com morfina (grupo DMV_2 , figura 2.E.) e com associação de morfina e melatonina (grupo $DMMel$, figura 2.F.) seguem o perfil e score inflamatório descritos para o grupo DV_1V_2 (figura 2.C.). Curiosamente, o grupo infiltrado com CFA associado à melatonina (DV_1Mel), na figura 2.D., apresenta uma diminuição nas espécies coradas pela eosina e estrutura mais preservada da ATM (reação inflamatória moderada, score inflamatório = 2).

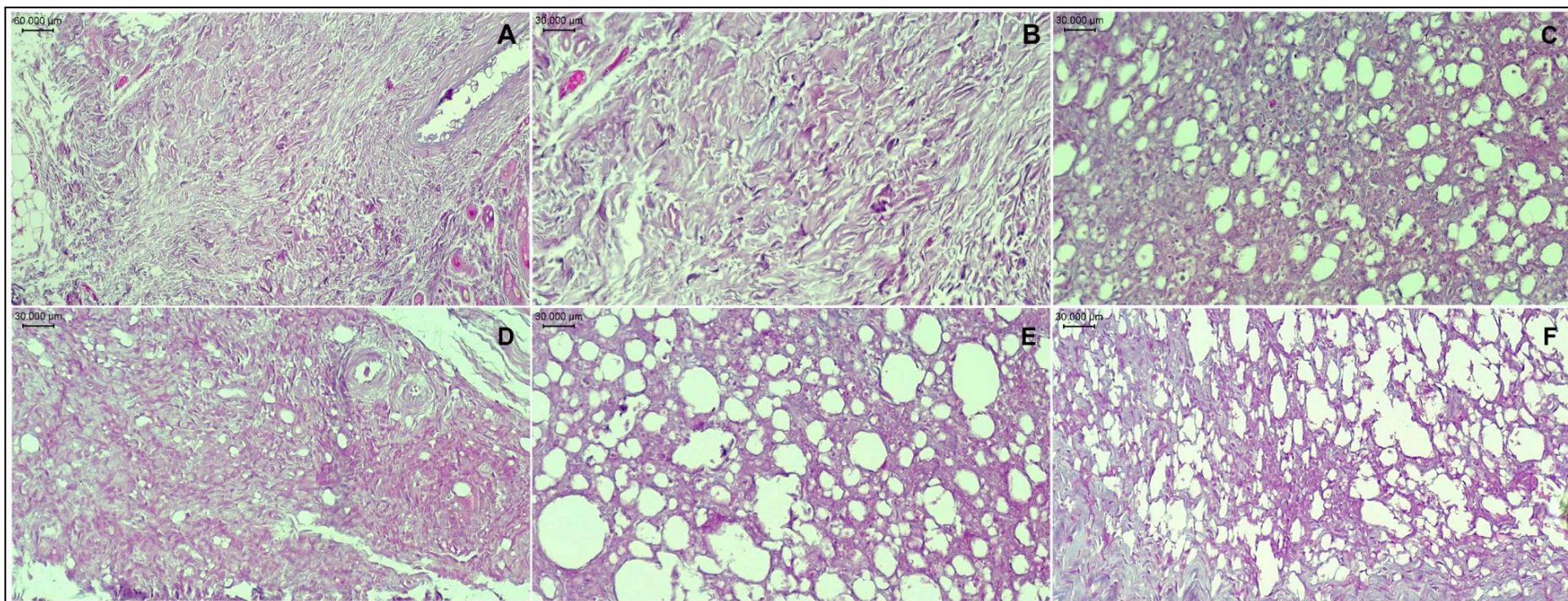


FIGURA 2. Imagem histológica representativa dos grupos (coloração HE). A) Grupo SV₁V₂ em menor aumento (100x, barra de escala em 60µm; score inflamatório = 0); B) Grupo SV₁V₂ em maior aumento (200x, barra de escala em 30µm; score inflamatório = 0), com presença inespecífica de células mononucleares adjacentes; C) Grupo DV₁V₂, com acúmulo de CFA no tecido, cercado por reação inflamatória intensa e presença exacerbada de células imunes mononucleares (200x, barra de escala em 30µm; score inflamatório = 3); D) Grupo DV₁Mel, com moderada presença de células imunes mononucleares (200x, barra de escala em 30µm; score inflamatório = 2); E) Grupo DMV₂, com presença exacerbada de células imunes mononucleares (200x, barra de escala em 30µm; score inflamatório = 3); F) Grupo DMMel, com presença exacerbada de células imunes mononucleares (200x, barra de escala em 30µm; score inflamatório = 3).

5. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que a administração de 50 µl CFA, (1 µg/µl) injetados no interior da ATM direita, foi capaz de induzir o modelo de AAT, evidenciado por um perfil morfológico com acúmulo de CFA e reação inflamatória tecidual intensa. Também foi observada neuroinflamação nos animais com AAT, demonstrada pelo aumento nos níveis de TNF-α e IL-10 no tronco encefálico após intervenção com CFA. Por outro lado, houve uma diminuição nos níveis de BDNF em tronco encefálico no grupo tratado com melatonina. Interessantemente, a histologia da ATM dos animais tratados com melatonina apresentou uma redução moderada na inflamação local e este efeito foi prevenido quando a melatonina foi associada ao tratamento com morfina.

A inflamação induzida pelo CFA promove uma resposta inflamatória bifásica: inicial (inflamação aguda) e tardia (inflamação crônica, considerada a partir do décimo quarto dia após a injeção do CFA), permitindo o estudo da fisiopatologia na condição crônica dolorosa de AAT (PHILIPPE *et al.*, 1997). Níveis aumentados de TNF-α no tronco encefálico são esperados neste modelo, visto que a região da ATM que recebe o insulto inflamatório é innervada por ramos específicos do nervo trigêmeo, o qual tem origem principal no tronco encefálico, mais especificamente na ponte (HUFF *et al.*, 2022). As citocinas medeiam a inflamação aguda e crônica e a destruição associada do tecido conjuntivo nas ATMs artríticas.

Citocinas pró-inflamatórias como o TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-8 e IFN-gama estão associadas à inflamação nas articulações sinoviais e à destruição do tecido conjuntivo (KACENA *et al.*, 2001), enquanto citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10 atuam como inibidores do processo inflamatório. Corroborando nossos achados, estudos pré-clínicos demonstraram que a injeção de CFA na ATM resulta em uma elevação sustentada de diversos mediadores inflamatórios por um período de até seis semanas, como o TNF-α (DO NASCIMENTO e LEITE-PANISSI, 2014; SPEARS *et al.*, 2005). Além disso, levando em consideração os níveis aumentados de IL-10 no tronco encefálico, observados em nosso estudo, é possível sugerir que estejam intrinsecamente ligados a um período mais resolutivo do processo inflamatório (IYER & CHENG, 2012), considerando-se que as análises foram realizadas 23 dias após a indução do modelo de dor.

Um estudo anterior demonstrou que a injeção intra-articular de CFA em ATM de ratos induz alterações específicas do tecido mole, incluindo infiltração de células inflamatórias e formação precoce de *pannus* (MOREL *et al.*, 2019). A inflamação do tecido induzida pela injeção de CFA resulta na liberação de mediadores inflamatórios, incluindo níveis mais altos de IL-1β e TNF-α na ATM (WANG *et al.*, 2012). Em contraste, outro estudo anterior do

grupo de pesquisa, conduzido por Vicenzi e colaboradores (2022), não encontrou nenhuma alteração significativa nos níveis de IL-1 β e IL-10 nos gânglios trigeminais ipsilaterais e contralaterais nos grupos experimentais. No entanto, foi observado que, em animais do grupo DOR, os níveis de IL-1 β do lado contralateral são menores que os do lado ipsilateral à injeção, sugerindo uma eventual regulação da atividade inflamatória local. Além disso, o mesmo estudo mostrou uma correlação entre níveis mais baixos de IL-1 β e maior nocicepção (VICENZI *et al.*, 2022). Vale ressaltar que a IL-1 β tem um efeito duplo na nocicepção, pois pode desencadear efeitos anti ou pró-nociceptivos (SOUTER *et al.*, 2000). Recentemente, um estudo publicado pelo grupo de pesquisa utilizando o mesmo modelo de AAT, mostrou uma redução significativa nos níveis de TNF- α no tronco encefálico induzido pelo CFA em ratas ovariectomizadas (KROEFF *et al.*, 2024). Entretanto, as diferenças dos estudos citados e o presente estudo quanto ao sexo dos animais e as intervenções cirúrgicas, farmacológicas e hormonais empregadas não podem ser desconsideradas.

No presente estudo não foram observadas alterações dos níveis de BDNF em ratos Wistar com AAT (23 dias após a indução do modelo). Por outro lado, estudos prévios do grupo de pesquisa encontraram um aumento significativo nos níveis de BDNF no tronco encefálico 16 dias após a indução da dor orofacial em ratos Sprague Dawley com AAT (SCARABELOT, *et al.*, 2016; SCARABELOT, *et al.*, 2019). É possível que a diferença nas linhagens dos ratos seja um fator determinante neste resultado. No entanto, quando os animais submetidos ao modelo de AAT foram tratados com melatonina, apresentaram redução dos níveis de BDNF no tronco encefálico, sendo essa uma neurotrofina fundamental no desenvolvimento e manutenção da dor (ESPOSITO & CUZZOCREA, 2010). Este resultado corrobora estudos prévios do grupo, os quais demonstraram que animais submetidos à infiltração de CFA e tratados com melatonina tiveram uma redução dos níveis de BDNF em tronco encefálico (LASTE *et al.*, 2013, SCARABELOT, *et al.*, 2016). É importante salientar que Laste e colaboradores (2013) utilizaram o modelo de infiltração de CFA em nervo isquiático. A liberação excessiva de BDNF tem sido relacionada ao desenvolvimento e manutenção da condição dolorosa (SIKANDAR *et al.*, 2018; SOSANYA *et al.*, 2019). Sabe-se que o BDNF tem um papel pró nociceptivo bem documentado em processos de dor inflamatória e neuropática (ZHANG *et al.*, 2013). Trabalhos anteriores reportam que a cascata do receptor BDNF-TrkB no circuito da medula ventromedial rostral (RVM) está envolvida no desenvolvimento de dor persistente após a inflamação (GUO *et al.*, 2006; TAO *et al.*, 2014). Adicionalmente, o BDNF regula de forma negativa o cotransportador K⁺-Cl⁻ (KCC2) que mantém o gradiente Cl⁻ nas sinapses inibitórias do GABA, diminuindo a inibição do GABA e

resultando na facilitação da sinalização da dor (TANAKA *et al.*, 2008). Desta forma, é possível sugerir que, pelo menos em parte, o conhecido efeito analgésico da melatonina (LASTE *et al.*, 2013; SCARABELOT *et al.*, 2016; HEMATI *et al.*, 2020) esteja relacionado a sua capacidade de diminuir níveis centrais de BDNF.

O efeito anti-inflamatório moderado observado nos animais tratados com melatonina corrobora com estudos prévios que demonstram seu potencial anti-inflamação (LASTE *et al.*, 2013; SCARABELOT *et al.*, 2016; HEMATI *et al.*, 2020). Os mecanismos possíveis pelos quais a melatonina pode interferir no processo inflamatório incluem a inibição da produção de óxido nítrico (espécie reativa de oxigênio) e a redução da expressão da óxido nítrico sintase, ativação do fator nuclear kappa-B, redução dos níveis de prostaglandinas e da expressão da ciclooxigenase-2, além da redução do recrutamento polimorfonuclear no local da inflamação (CUZZOCREA *et al.*, 2007; ESPOSITO *et al.*, 2010). Além disso, os receptores de melatonina da membrana (MT1 e MT2) foram identificados em estruturas do sistema nervoso envolvidas na transmissão nociceptiva (AMBRIZ-TUTUTI *et al.*, 2009), como o tálamo, o corno dorsal da medula espinhal, o trato trigeminal e o núcleo trigeminal (WEAVER *et al.*, 1989; WILLIAMS *et al.*, 1995). Estima-se que esses receptores desempenhem um papel crítico na antinocicepção induzida pela melatonina em modelos de dor nociceptiva, neuropática e inflamatória (AMBRIZ-TUTUTI & GRANADOS-SOTO, 2007; AMBRIZ-TUTUTI *et al.*, 2009).

Na realização de nosso estudo não se observou efeito do simultâneo do CFA e tratamento com melatonina nos marcadores de neuroinflamação, sendo possível sugerir que a dose e o tempo de tratamento utilizados não foram capazes de promover alterações significativas nos biomarcadores centrais analisados. É importante pontuar que não foram observados efeitos significativos da morfina em nenhum dos parâmetros analisados, assim como no perfil inflamatório histológico local. No entanto, o efeito anti-inflamatório local da melatonina foi mitigado pela co-administração de morfina. De acordo, é estabelecido na literatura que a morfina ativa os receptores do tipo toll 4 (TLR4) e supra regula a produção de citocinas pró-inflamatórias (GLATTARD *et al.*, 2010). Um estudo utilizando modelo de sepse em ratos mostrou que o tratamento com morfina causou alterações celulares no hipocampo e aumentos nos níveis de IL-1 β (AYIENG'A *et al.*, 2023). Estes dados demonstram o potencial pró-inflamatório da morfina, fator que pode determinar a prevenção do efeito anti-inflamatório da melatonina.

6. CONCLUSÕES

Com base na alta similaridade estrutural e fisiológica da ATM de ratos e humanos (SUZUKI, 2016), o trabalho pode contribuir para o melhor entendimento das vias de dor e do modelo induzido de AAT. O modelo de AAT induziu um aumento de TNF- α associado a um aumento de IL-10 no tronco cerebral, provavelmente devido ao processo da AAT estar em uma fase mais resolutiva do período inflamatório (23 dias após a infiltração de CFA). No entanto, a inflamação local ainda estava presente, o que tornou possível a observação de uma moderada atividade anti-inflamatória da melatonina, evidenciado por um perfil histológico com menor escore de inflamação na ATM, comparado ao grupo não tratado, sendo este efeito, prevenido pela co-administração com morfina. Este resultado demonstra a necessidade de novos estudos que busquem clarificar esta complexa interação entre melatonina e morfina nos parâmetros inflamatórios dos processos da dor crônica orofacial. Em suma, estes resultados demonstram que: 1) a infiltração de CFA na ATM é um modelo efetivo indutor de AAT; 2) o potencial da melatonina como possível tratamento adjuvante do processo inflamatório da AAT e 3) a importância do conhecimento de possíveis interações antagônicas entre os fármacos utilizados em processos de dor crônica, como observado entre a morfina e a melatonina.

Agradecimentos: Este estudo foi financiado pelo Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE/HCPA - 2020-0689). Bolsa Ações Afirmativas HCPA/CNPq (Hemily Barbosa Braga), CAPES/bolsa de doutorado (Msc Natália Garcia dos Santos), Bolsa de Produtividade 1C CNPq (Dr^a Iraci Lucena Torres), Bolsa PDJ/CNPq (Dr Dirson Stein).

REFERÊNCIAS

- AMBRIZ-TUTUTI, Mónica et al. Melatonin: A hormone that modulates pain. **Life Sciences**, 2009.
- AMBRIZ-TUTUTI, Mónica; GRANADOS-SOTO, Vinicio. Oral and spinal melatonin reduces tactile allodynia in rats via activation of MT2 and opioid receptors. **Pain**, [s. l.], v. 132, n. 3, 2007.
- ARREOLA-ESPINO, Rosaura et al. Melatonin reduces formalin-induced nociception and tactile allodynia in diabetic rats. **European Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 577, n. 1–3, 2007.
- AYIENG'A, Evans O et al. "Morphine aggravates inflammatory, behavioral, and hippocampal structural deficits in septic rats." **Scientific reports**. vol. 13,1 21460. 5 Dec. 2023.
- BARON, Ralf; BINDER, Andreas; WASNER, Gunnar. Neuropathic pain: Diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. **The Lancet Neurology**, 2010.
- BICKLER, Philip E.; FAHLMAN, Christian S. The inhaled anesthetic, isoflurane, enhances Ca²⁺-dependent survival signaling in cortical neurons and modulates MAP kinases, apoptosis proteins and transcription factors during hypoxia. **Anesthesia and Analgesia**, [s. l.], v. 103, n. 2, 2006.
- BRADFORD, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.
- BRASIL. **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**. 2008.
- CUZZOCREA, Salvatore et al. Protective effect of melatonin in carrageenan-induced models of local inflammation: Relationship to its inhibitory effect on nitric oxide production and its peroxynitrite scavenging activity. **Journal of Pineal Research**, [s. l.], v. 23, n. 2, 1997.
- DA SILVA TORRES, Iraci Lucena et al. Long-lasting delayed hyperalgesia after chronic restraint stress in rats - Effect of morphine administration. **Neuroscience Research**, [s. l.], v. 45, n. 3, 2003.
- DO NASCIMENTO GC & LEITE-PANISSI CR. Time-dependent analysis of nociception and anxiety-like behavior in rats submitted to persistent inflammation of the temporomandibular joint. **Physiol Behav**. 2014 Feb 10;125:1-7.
- ESPOSITO, Emanuela et al. Melatonin reduces hyperalgesia associated with inflammation. **Journal of Pineal Research**, [s. l.], v. 49, n. 4, 2010.
- ESPOSITO, Emanuela e CUZZOCREA, Salvatore. Antiinflammatory Activity of Melatonin

in Central Nervous System. **Current Neuropharmacology**, [s. l.], v. 8, n. 3, 2010.

FAN, Yuchao et al. Role of endogenous melatonergic system in development of hyperalgesia and tolerance induced by chronic morphine administration in rats. **Brain Research Bulletin**, [s. l.], v. 135, 2017.

FIELDS, Howard L. The Doctor's Dilemma: Opiate Analgesics and Chronic Pain. **Neuron**, 2011.

FILHO, Paulo Ricardo Marques et al. Transcranial direct current stimulation (tDCS) reverts behavioral alterations and brainstem BDNF level increase induced by neuropathic pain model: Long-lasting effect. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, [s. l.], v. 64, 2016.

FUENTES, R. et al. Injection in temporomandibular joint of rats. Description of technical protocol. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, [s. l.], v. 20, n. 2, 2017.

GLATTARD, Elise et al. "Endogenous morphine levels are increased in sepsis: a partial implication of neutrophils." *PloS one*. vol. 5,1 e8791. 20 Jan. 2010.

GUO, Wei et al. "Supraspinal brain-derived neurotrophic factor signaling: a novel mechanism for descending pain facilitation." *The Journal of neuroscience*. vol. 26,1 (2006): 126-37.

GUZMAN-SILVA, Maria. A. et al. **Tramadol minimizes potential pain during post-oophorectomy in Wistar rats**. [s.l: s.n.].

HEMATI, Karim et al. Melatonin and morphine: potential beneficial effects of co-use. **Fundam Clin Pharmacol**. 2021 Feb;35(1):25-39.

HESTEHAVE, Sara et al. The analgesic efficacy of morphine varies with rat strain and experimental pain model: implications for target validation efforts in pain drug discovery. **European Journal of Pain**, [s. l.], v. 23, n. 3, 2019.

HOLSON, R. Robert. Euthanasia by decapitation: Evidence that this technique produces prompt, painless unconsciousness in laboratory rodents. **Neurotoxicology and Teratology**, [s. l.], v. 14, n. 4, 1992.

HOSSEINZADEH, Azam et al. Molecular Aspects of Melatonin Treatment in Tinnitus: A Review. **Current Drug Targets**, [s. l.], v. 20, n. 11, 2019.

HUFF, Trevor; WEISBROD, Luke J.; DALY, Daniel T. **Neuroanatomy, Cranial Nerve 5 (Trigeminal)**. [s.l: s.n.].

HUSSAIN ADIL, Iftikhar; UR REHMAN IRSHAD, Ateeq. A Modified Approach for Detection of Outliers. **Pak.j.stat.oper.res**. [s.l: s.n.].

IYER, Shankar Subramanian; CHENG, Genhong. Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. **Critical Reviews in Immunology**, [s.

l.], v. 32, n. 1, 2012.

JOSEPH, Herman; STANCLIFF, Sharon; LANGROD, John. Methadone maintenance treatment (MMT): A review of historical and clinical issues. In: MOUNT SINAI JOURNAL OF MEDICINE 2000, **Anais...** [s.l: s.n.]

KACENA, Melissa A. et al. Inflammation and bony changes at the temporomandibular joint. In: CELLS TISSUES ORGANS 2001, **Anais...** [s.l: s.n.]

KRAYCHETE, Durval Campos; CALASANS, Maria Thais De Andrade; VALENTE, Camila Motta Leal. Pro-inflammatory cytokines and pain. **Revista Brasileira de Reumatologia**, 2006.

KROEFF, Giovana Paola Heck et al. Hormone replacement therapy did not alleviate temporomandibular joint inflammatory pain in ovariectomized rats. **Odontology**, [s. l.], 2024.

LASTE, Gabriela et al. After-effects of consecutive sessions of transcranial direct current stimulation (tDCS) in a rat model of chronic inflammation. **Experimental Brain Research**, [s. l.], v. 221, n. 1, 2012.

LASTE, Gabriela et al. Melatonin Treatment Entrain the Rest-Activity Circadian Rhythm in Rats With Chronic Inflammation. **Chronobiology International**, 2013.

MAI, Jie Zhen et al. Oral application of bulleyaconitine A attenuates morphine tolerance in neuropathic rats by inhibiting long-term potentiation at C-fiber synapses and protein kinase C gamma in spinal dorsal horn. **Molecular Pain**, [s. l.], v. 16, 2020.

MOREL M, Ruscitto A, Pylawka S, Reeve G, Embree MC. Extracellular matrix turnover and inflammation in chemically-induced TMJ arthritis mouse models. **PLoS One**. 2019 Oct 11;14(10):e0223244.

NARITA, Minoru et al. Implication of activated astrocytes in the development of drug dependence: Differences between methamphetamine and morphine. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 2008.

NIDCR. **National Institute of Dental and Craniofacial Research**. 2020.

PHILIPPE, Lionel et al. Relations between functional, inflammatory, and degenerative parameters during adjuvant arthritis in rats. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, [s. l.], v. 273, n. 4 42-4, 1997.

PROPHET, Edna B. et al. **Afip Laboratory methods in histotechnology**. [s.l: s.n.].

RAJA, Srinivasa N. et al. The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. **Pain**, [s. l.], v. 161, n. 9, p. 1976–1982, 2020.

ROBIN, Dwi Merry Christmarini. Establishment of a rat model of temporomandibular joint

osteoarthritis using intraarticular injection of complete freund's adjuvant. **UNEJ e-Proceeding**, [S.l.], p. 190-193, jan. 2017

ROECKEL, Laurie Anne et al. Morphine-induced hyperalgesia involves mu opioid receptors and the metabolite morphine-3-glucuronide. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 7, n. 1, 2017.

ROZISKY, Joanna Ripoll et al. Long-term effect of morphine administration in young rats on the analgesic opioid response in adult life. **International Journal of Developmental Neuroscience**, [s. l.], v. 26, n. 6, 2008.

SBDOF. **Sociedade Brasileira de Disfunção Temporomandibular e Dor Orofacial**. 2020. Disponível em: <<https://sbdof.com.br/>>. Acesso em: 5 jul. 2024.

SBED. **Sociedade Brasileira para Estudos da Dor**. 2018. Disponível em: <<https://www.sbed.org/home.php>>. Acesso em: 5 jul. 2024.

SCARABELOT, Vanessa L. et al. Transcranial direct-current stimulation reduces nociceptive behaviour in an orofacial pain model. **Journal of Oral Rehabilitation**, [s. l.], v. 46, n. 1, 2019.

SCARABELOT, Vanessa Leal et al. Melatonin Alters the Mechanical and Thermal Hyperalgesia Induced by Orofacial Pain Model in Rats. **Inflammation**, [s. l.], v. 39, n. 5, 2016.

SIKANDAR S, et al. Brain-derived neurotrophic factor derived from sensory neurons plays a critical role in chronic pain. **Brain**. 2018 Apr 1;141(4):1028-1039.

SIQUEIRA-LIMA, Pollyana S. et al. **Natural products assessed in animal models for orofacial pain – a systematic review**. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 2017.

SMITH, William. Responses of laboratory animals to some injectable anaesthetics. **Laboratory Animals**, [s. l.], v. 27, n. 1, 1993.

SONG, Li; WU, Chaoran; ZUO, Yunxia. Melatonin prevents morphine-induced hyperalgesia and tolerance in rats: Role of protein kinase C and N-methyl-D-aspartate receptors. **BMC Anesthesiology**, [s. l.], v. 15, n. 1, 2015.

SOSANYA, Natasha M. et al. Involvement of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in chronic intermittent stress-induced enhanced mechanical allodynia in a rat model of burn pain. **BMC Neuroscience**, [s. l.], v. 20, n. 1, 2019.

SOUTER, Andrew J.,et al. Spinal interleukin-1 β reduces inflammatory pain. **Pain**, [s. l.], v. 86, n. 1–2, 2000.

SPEARS R, et al. Temporal changes in inflammatory mediator concentrations in an adjuvant model of temporomandibular joint inflammation. **Journal Orofac Pain**. 2005 Winter;19(1):34-40.

SU, Jing Jing et al. Acid-sensing ion channels activation and hypoxia upregulate homer1a expression. **CNS Neuroscience and Therapeutics**, [s. l.], v. 20, n. 3, 2014.

SUZUKI, A.; IWATA, J. Mouse genetic models for temporomandibular joint development and disorders. **Oral Diseases**, [s. l.], v. 22, n. 1, 2016.

TANAKA E, DETAMORE MS, MERCURI LG. Degenerative disorders of the temporomandibular joint: etiology, diagnosis, and treatment. **J Dent Res**. 2008 Apr;87(4):296-307.

TAO, Wenjuan et al. "Persistent inflammation-induced up-regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) promotes synaptic delivery of α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor GluA1 subunits in descending pain modulatory circuits." **The Journal of biological chemistry** vol. 289,32 (2014): 22196-204.

TOTSCH, Stacie K.; SORGE, Robert E. **Immune system involvement in specific pain conditions****Molecular Pain**, 2017.

VAILLANCOURT, Cathy; BERGER, Neil; BOKSA, Patricia. Effects of vaginal birth versus caesarean section birth with general anesthesia on blood gases and brain energy metabolism in neonatal rats. **Experimental Neurology**, [s. l.], v. 160, n. 1, 1999.

VAN RIJN, Clementina M. et al. Decapitation in rats: Latency to unconsciousness and the "wave of death". **PLoS ONE**, [s. l.], v. 6, n. 1, 2011.

VANECEK, Jiri. Cellular mechanisms of melatonin action. **Physiological Reviews**, 1998.

VICENZI, Cristina Balensiefer et al. **Avaliação da confiabilidade de um modelo de dor orofacial inflamatória crônica induzido pela administração intra-articular de adjuvante completo de Freund (CFA) em Ratos Wistar**. 2022. [s. l.], 2022.

WANG, Shuxing et al. Exacerbated mechanical hyperalgesia in rats with genetically predisposed depressive behavior: Role of melatonin and NMDA receptors. **Pain**, [s. l.], v. 153, n. 12, 2012.

WANG XD et al. Sustained inflammation induces degeneration of the temporomandibular joint. **J Dent Res**. 2012 May;91(5):499-505.

WEAVER, D. R.; RIVKEES, S. A.; REPERT, S. M. Localization and characterization of melatonin receptors in rodent brain by in vitro autoradiography. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 9, n. 7, 1989.

WEI, Yi-Ming; XU, Ying; CHANG-XI, Y. U. Effect of melatonin on the content of β -endorphin in the hypothalamic arcuate nucleus and periaqueductal grey of midbrain in morphine withdrawal mice. **Acta Physiologica Sinica**. [s.l: s.n.]. Disponível em:

<<http://www.actaps.com.cn>>.

WILLIAMS, J. T.; CHRISTIE, M. J.; MANZONI, O. Cellular and synaptic adaptations mediating opioid dependence. **Physiological Reviews**, 2001.

WILLIAMS, Lynda M. et al. Melatonin receptors in the rat brain and pituitary. **Journal of Pineal Research**, [s. l.], v. 19, n. 4, 1995.

WOOD, Andrew K. W. et al. Prolonged general anesthesia in MR studies of rats. **Academic Radiology**, [s. l.], v. 8, n. 11, 2001.

WU, Shaogen et al. Dorsal root ganglion transcriptome analysis following peripheral nerve injury in mice. **Molecular Pain**, [s. l.], v. 12, 2016.

ZHAO, Jing et al. Molecular and cellular mechanisms of the age-dependency of opioid analgesia and tolerance. **Molecular Pain**, 2012.

ZÚÑIGA-ROMERO, Angel et al. Combination of diacerhein and antiepileptic drugs after local peripheral, and oral administration in the rat formalin test. **Drug Development Research**, [s. l.], v. 75, n. 8, 2014.