

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

MATHEUS HENRIQUE SILVA

**EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA INIBIÇÃO DA ENZIMA EPÓXIDO
HIDROLASE SOLÚVEL (EHS) EM UM MODELO DE NEURALGIA DO
TRIGÊMIO EM ROEDORES**

UBERLÂNDIA

2018

MATHEUS HENRIQUE SILVA

**EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA INIBIÇÃO DA ENZIMA EPÓXIDO
HIDROLASE SOLÚVEL (EHS) EM UM MODELO DE NEURALGIA DO
TRIGÊMIO EM ROEDORES**

Trabalho de Conclusão de Curso II apresentado ao curso de Biomedicina, da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para obtenção do grau de bacharel em biomedicina.

Área de concentração: Bioquímica

Orientadora: Dra. Cássia Regina da Silva

UBERLÂNDIA

2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço a meus pais pelo amor, pelo apoio, pela ajuda. A minha família pelo apoio, em especial minha irmã Lorrane por estar ao meu lado frente aos desafios enfrentados durante esses quatro anos. Aos meus amigos por terem me dado apoio, um ombro amigo, conselhos e por me fazer rir frente a situações desesperadoras, dentre eles devo citar Alexandre, Ana Carolina, Diego, Fernando, Juliano, Amanda, Denise, Igor, Karolline, Natasha, Sthéfanny e Victória.

Sou grato a essa universidade, a seu corpo docente, direção e administração. Dentre os professores, que foram de grande importância para tal processo devo falar de três pessoas especiais, primeiramente a professora Dra. Benvinda, por ter sido minha mãe na ciência e me apresentado a um fantástico mundo de estudos e inovações. Também devo falar da professora Dra. Ana Carolina, que com sua plenitude me ensinou que somos capazes de transpassar barreiras que para outros são impenetráveis, e também por ter aceito o desafio de criar o Jornal da Biomedicina. E por último o professor Dr. Roberto, que com sua calma me mostrou que nem tudo pode ser feito no meu tempo e que o desespero pode alimentar as dificuldades e as tornar em maiores. Sou grato também a minha orientadora por ter compartilhado seu conhecimento e me ensinado a ter percepções de perspectivas diferentes.

Sou grato a cada pessoa que me ajudou a encontrar o caminho que sigo hoje e a conseguir viabilizar meus sonhos.

“Acredito que podemos continuar seguindo em frente, mesmo com as dores, com as lágrimas, com a cabeça a mil, sem medo de pedir ajuda. ”

(BOVOLENTO, 2018)

RESUMO

A neuralgia do trigêmeo é um tipo de neuropatia periférica causada por lesão no nervo trigêmeo, o mais amplamente distribuído na cabeça. Recentemente demonstrou-se que a inibição da enzima epóxido hidrolase solúvel (EHS) causou analgesia em animais com neuropatia diabética, sugerindo uma nova via para o estudo e tratamento das neuropatias. A enzima EHS catalisa a degradação de ácidos epóxieicosatrienoicos (EET) convertendo-os em metabólitos inativos. Assim, a inibição da EHS estabiliza as concentrações citoplasmáticas de EET, que apresentam atividade anti-inflamatória e anti-nociceptiva em diferentes modelos de dor. A hipótese do presente projeto é de que a inibição da enzima epóxido hidrolase solúvel previna o estresse do retículo endoplasmático e estabilize as concentrações de EETs diminuindo a dor resultante da neuropatia trigeminal. Desta forma, os objetivos do presente estudo foram: padronizar o modelo de neuropatia do trigêmeo por constrição do nervo infraorbital no laboratório e, avaliar o possível efeito antinociceptivo do inibidor da EHS (TPPU) em um modelo de neuralgia do trigêmeo em camundongos. Foi realizado a padronização do modelo de neuralgia trigeminal em camundongos, e foi observado que o limiar mecânico dos animais CION, do inglês “constriction of the infraorbital nerve” (constrição do nervo infraorbital), diminuiu após a cirurgia de constrição do nervo infraorbital e o mesmo não ocorreu com os outros animais, que não foram submetidos a cirurgia (naive) e os falso operados (sham). A avaliação da resposta espontânea e sensibilidade térmica não demonstrou nenhuma alteração e devido a isso estes parâmetros não foram observados nos experimentos subsequentes. Os testes comportamentais, Von Frey, resposta espontânea e sensibilidade térmica foram realizados nos dias 3, 7, 10, 15 e 20 após a cirurgia. Quando foi realizado o tratamento com o inibidor da EHS, TPPU na dose de 3mg/kg (iniciado no dia 3 pós cirurgia), foi possível observar que os animais tratados apresentaram queda do limiar mecânico em relação aos animais tratados com veículo, o que indica efeito analgésico da inibição da EHS, observado em todos os dias de tratamento.

Palavras chave: Dor crônica. Neuralgia trigeminal. Ácidos epóxieicosatrienoicos. Epóxido hidrolase solúvel. Estresse do retículo endoplasmático.

Lista de Tabelas

- Tabela 1- Avaliação do limiar mecânico para padronização do modelo de neuralgia do trigêmeo..... 22
- Tabela 2- Avaliação da resposta espontânea para padronização do modelo de neuralgia do trigêmeo..... 23
- Tabela 3- Avaliação da resposta ao estímulo frio para padronização do modelo de neuralgia do trigêmeo..... 25
- Tabela 4- Efeito da dose única do TPPU sobre o limiar mecânico dos animais submetidos a CION..... 26
- Tabela 5- Teste pos hoc de Student Newman Keuls para a avaliação do limiar mecânico durante o tratamento diário..... 27

Lista de Gráficos

- Gráfico 1- Curva do limiar mecânico em função do tempo de experimento para padronização do modelo de neuralgia do trigêmeo..... 22
- Gráfico 2- Curva do tempo de grooming facial em função do tempo de experimento para padronização do modelo de neuralgia trigeminal..... 24
- Gráfico 3- Curva do tempo de resposta ao estímulo frio em função do tempo de experimento..... 25
- Gráfico 4- Efeito analgésico do tratamento com TPPU..... 27

Lista de Figuras:

- Figura 1- Classificação da dor..... 13
- Figura 2- Metabolismo do ácido araquidônico e atuação do TPPU..... 16
- Figura 3- Design experimental..... 18
- Figura 4 –Caixa de contenção..... 19
- Figura 5- Amarras no nervo infraorbital de um camundongo..... 20
- Figura 6- Escalas de dor..... 29

Lista de abreviaturas

- AA- Ácido Araquidônico
- B- basal
- CION- cirurgia de constrição do nervo infraorbital
- COX- cicloxigenases
- DHET- dihidroxieicosatrienoicos
- EETs- ácidos epóxieicosatrienoicos
- EHS- epóxido Hidrolase Solúvel
- iEHS- Inibidor da Epóxido Hidrolase Solúvel
- LOX- lipoxigenase
- NOX- óxido nítrico
- PEG 400- polietilenoglicol 400
- ROS- *reactive oxygen species*- espécies reativas de oxigênio
- ROX- reoxigenação
- SNC- Sistema Nervoso Central
- SNP- Sistema Nervoso Periférico
- TPPU- 1-trifluorometoxi fenil-3-(1propionil piperidina-4)-ureia

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	09
1.1. Anatomia e fisiologia da dor.....	09
1.2. Classificações da dor.....	11
1.3. Neuralgia trigeminal.....	14
1.4. Estresse do retículo endoplasmático.....	15
2. JUSTIFICATIVA.....	17
3. OBJETIVOS.....	17
3.1. Objetivo geral.....	17
3.2. Objetivo específico.....	18
4. METODOLOGIA.....	18
4.1. Animais.....	18
4.2. Design Experimental.....	18
4.3. Cirurgia de constrição do nervo infraorbital.....	19
4.4. Tratamentos.....	20
4.5. Testes comportamentais.....	20
4.6. Análise estatística.....	21
5. RESULTADOS	21
5.1- Cirurgia de constrição do nervo trigeminal causa redução do limiar mecânico.....	21
5.2. A CION não causou alterações no comportamento espontâneo e na resposta a estímulos frio.....	23
5.3. Efeito antinociceptivo da inibição da EHS.....	25
6. DISCUSSÃO.....	28
7. CONCLUSÃO.....	31

BIBLIOGRAFIA.....	31
ANEXO I- COMPROVANTE DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UFU	37

1. INTRODUÇÃO

O entendimento sobre o que é dor é subjetivo e varia de acordo com o aprendizado de cada um, por isso, ao longo da história da humanidade a concepção de dor foi se alterando de acordo com o entendimento cultural e científico dos povos. Para as sociedades primitivas a dor era causada por lesões de perfuração no corpo com um objeto, sejam eles reais ou imaginários (MERSKEY, 1980). Já a Bíblia cristã fala que a dor é um castigo divino e a relaciona com a injúria, miséria e tristeza como descrito em Lamentações capítulo 1, versículos 12 e 13 e no livro de Isaías capítulo 53, versículo 3 (A BÍBLIA, 2014). Em contrapartida, os chineses acreditavam que a dor é resultado do desequilíbrio entre as forças energéticas do corpo (CHEN, 2001). Aristóteles ressaltou a importância de estímulos sensoriais (visão, olfato, audição, paladar e tato) como causa da dor, e dando continuidade a seu pensamento, Platão relacionou o entendimento de dor e prazer com os órgãos coração e fígado (MERSKEY, 1980). Essa linha de pensamento relaciona os aspectos sensoriais e emocionais para o entendimento da dor. Os estudos sobre histeria, sobretudo estudos freudianos, chamam atenção para a influência dos aspectos psicológicos com a dor, sendo capaz de modular e até mesmo ser a fonte de tal percepção, os problemas emocionais podem acarretar em sintomas corporais como mecanismo para sua resolução (MERSKEY, 2004).

A dor resulta da interpretação cerebral de um estímulo gerado por um dano tecidual, seja real ou apenas potencial (KUMAR; ELAVARASI, 2016). Levando em conta tais informações, e outras provindas de diversos estudos, a Associação Internacional para Estudos da Dor (IASP- *International Association for the Study of Pain*) define dor como “uma experiência sensorial e emocional desagradável com dano tecidual real ou potencial” (TREEDE, 2018). Devido ao envolvimento de fatores emocionais e culturais na interpretação da dor, os indivíduos podem ter entendimentos de dor distintos. Isso se dá pelo envolvimento do Sistema Nervoso Central (SNC) na interpretação da informação que lhe é trazida através do Sistema Nervoso Periférico (SNP). O envolvimento de algumas áreas do SNC cuja atividade está ligada a emoções e memórias fazem com que a interpretação da dor esteja sujeita a fatores emocionais (TEXEIRA; FIGUEIRÓ, 2001).

1.1. ANATOMIA E FISIOLOGIA DA DOR

As fibras nervosas aferentes são responsáveis por transportar estímulos sensoriais até o SNC. Dentre elas temos as fibras A β , que transportam estímulos sensitivos mecânicos, e fibras A δ e C, que transportam estímulos nocivos e são chamadas de nociceptores. As fibras A β ,

mielinizadas, são vias sensoriais aferentes mecanossensíveis, podendo carrear estímulos nociceptivos em casos de sensibilização central (VARANDAS, 2013).

Os nociceptores são polimodais, isto é, são carreadores de estímulos mecânicos, térmicos e químicos. Os nociceptores do tipo fibra A δ são pouco mielinizadas, tem espessura média e alta velocidade de condução; e do tipo C são desprovidas de bainha de mielina e com baixa velocidade de condução (LARSSON; BROMAN, 2018; WILLIS JR.; COGGESHALL, 1991).

Há dois tipos de fibras A δ , que geralmente estão relacionadas com dor aguda, as do tipo 1 e do tipo 2. O tipo 1 é sensível a estímulos mecânicos e possui limiar alto para estímulos térmicos, está presente na pele glabra e pele com pelo; já o tipo 2 possui limiar baixo para estímulos térmicos, e se adapta quando o estímulo térmico é intenso, pode ser insensível a estímulos mecânicos, e está presente na pele com pelo (TEXEIRA; FIGUEIRÓ, 2001). As fibras A δ são dependentes de fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) e neurotrofina-3 para transmitir informações (MERIGHI et al., 2008; TEXEIRA; FIGUEIRÓ, 2001).

As fibras do tipo C estão relacionadas com dores difusas e polimodais. Dentre as substâncias endógenas capazes de ativar as fibras C está a prostaglandina, histamina, citocinas, bradicinina, óxido nítrico, substância P, glutamato, ATP, entre outras (LARSSON; BROMAN, 2018). De acordo com o perfil neuroquímico destes nociceptores pode-se classificá-los em fibras C peptidérgicas e não peptidérgicas. Fibras C peptidérgicas contêm peptídeos, como por exemplo, substância P, o peptídeo relacionado com o gene da calcitonina (CGRP), fator de crescimento neuronal (NFG) e expressam o receptor de fator de crescimento do nervo (TrkA) e seus terminais estão localizadas na lâmina mais externa da medula espinal (lâmina I). As fibras do tipo C não peptidérgicas expressam o receptores P2X3 para BDNF e estão localizados na substância gelatinosa da medula espinal (lâmina II) (DALMOLIN, 2006; MERIGHI et al., 2008).

Os nociceptores estão presentes em neurônios sensoriais aferentes primários que convergem em gânglios, onde se localiza o corpo celular do neurônio sensorial, podendo ser os gânglios da raiz dorsal, para nervos periféricos, e o gânglio trigeminal para o nervo trigêmeo (FAGUNDES, 2017). Em seguida os nociceptores se inserem nas áreas sensitivas primária, corno dorsal da medula espinal e o núcleo espinal do trigêmeo (LOPES, 2003). Na medula espinal pode ocorrer a ativação de reflexos motores, por meio da ação dos interneurônios, como também, o transporte de informação para as áreas supraespinhais, por meio das vias espino-

talâmicas e espino-parabraquial. A via espino-talâmica se origina da lâmina II da medula espinal e se insere no tálamo, que estabelece comunicação somatossensorial, e ainda, estabelece comunicações com as vias do sistema límbico, onde ocorre o envolvimento com emoções e relação com a memória para a percepção da dor. A via espino-parabraquial se origina da lâmina I e estabelece comunicação com área parabraquial que pode ser direcionada para amígdala ou para o hipotálamo e tálamo (LEAL, 2016). O tálamo é uma estrutura fundamental para a percepção da dor; os núcleos ventroposteriomedial e ventroposteriolateral estão envolvidos na diferenciação do estímulo sensitivo causador da nocicepção (BESSON; GUILBAUD; OLLAL, 1995; NOSEDA; VILLANUEVA, 2017). Os estímulos nociceptivos são transportados até o córtex cerebral, onde diferentes áreas serão ativadas, sobretudo a área somatossensorial primária, que está relacionada com a localização do estímulo nociceptivo (APKARIAN, 1995; UNG et al., 2014).

A dor nociceptiva é causada pela ativação fisiológica dos receptores da dor. As lesões teciduais desencadeiam reações inflamatórias e, conseqüentemente, a ativam as vias aferentes carreadoras dos estímulos nociceptivos. A ativação desses nociceptores pode ocorrer devido a estímulos mecânicos, térmicos e químicos, podendo ser ativados por substâncias endógenas e exógenas, estas podem ativar receptores da membrana citoplasmática ou agir no meio citoplasmático. Os nociceptores podem informar a localização e a intensidade do estímulo nociceptivo sendo de suma importância para percepção de agentes lesivos (LOESER; TREEDE, 2008). A dor pode ainda ter caráter patológico quando deixa de ser apenas um sinal de alerta e passa a ser considerado uma doença, podendo então ser classificada de acordo com a duração, fisiopatologia e etiologia (VARANDAS, 2013).

1.2. CLASSIFICAÇÕES DA DOR

A classificação quanto a duração divide a dor em duas categorias: dor aguda e crônica (figura 1). A dor aguda está relacionada com estímulo mecânicos, térmicos e químicos associados a lesões teciduais ou processos patológicos como infecções e processos inflamatórios de curta duração (até três meses) (CARR; GOUDAS, 1999). Esse tipo de dor leva a ativação do sistema nervoso autônomo e pode gerar resposta motoras através do arco reflexo, onde o nervo sensitivo carrega o estímulo nociceptivo até o corno dorsal da medula espinal e o neurônio intermediário realiza a comunicação entre a fibra sensitiva e a fibra motora provocando o movimento reflexo. Analgésicos costumam ser eficazes para tais situações (CORRAL TUESTA, 2018). A dor crônica per dura por três meses ou mais e não, necessariamente, está relacionada com estímulo nocivo. Em geral está associada a algum

processo patológico causador de alterações teciduais ou nervosas resultando no aumento da sensibilidade por meio da diminuição do limiar de dor frente a estímulos, que nem sempre são nocivos, ou ainda podem estimular as terminações nervosas por período prolongado e causar potenciais espontâneos e ectópicos (GOLD; GEBHART, 2010).

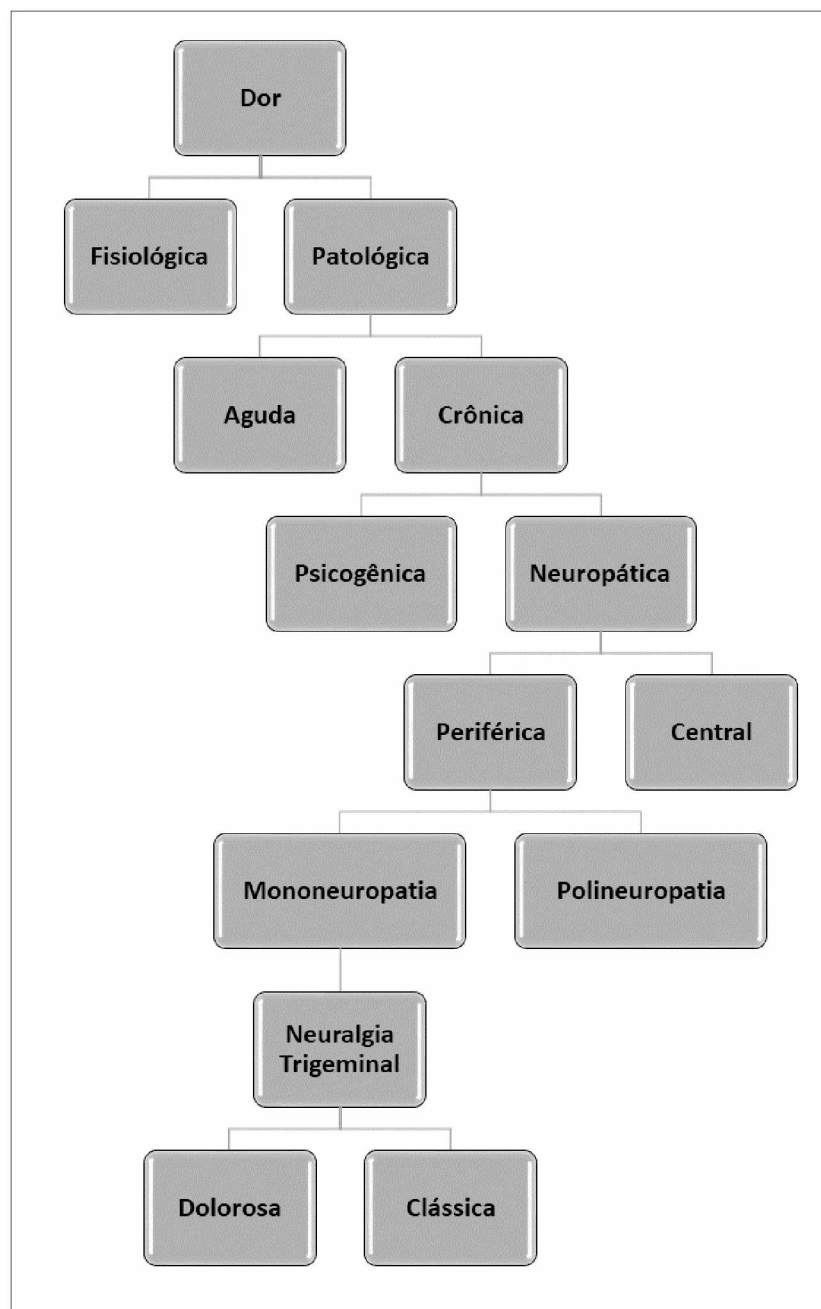
Os critérios fisiopatológicos permitem classificar a dor crônica em psicogênica e neuropática. A dor psicogênica está mais ligada com a atividade mental e emocional do indivíduo. Quando a dor existe sem um processo de injúria ou persiste após a resolução da injúria ela pode ser entendida como uma dor psicogênica. Ela está relacionada com memórias traumáticas do indivíduo, que por sua vez, são capazes de reproduzir as excitações neuronais causadas quando o indivíduo vivenciou o evento traumático. Pode estar associada a distúrbios psiquiátricos, ou ainda, a perda de um membro acarretando a sensação de dor no membro amputado, devido a participação de áreas do SNC responsáveis pela memória (FELLER et al., 2017; ZEMEL; BLIER, 2016). A dor neuropática é um dos tipos de dores crônicas relacionada com lesões ou doenças que afetam o sistema nervoso central (SNC) ou periférico (SNP) e, justamente por isso, elas são classificadas em neuropatias centrais e periféricas.

As neuropatias centrais podem ocorrer devido a atividade anormal ou hiperatividade dos núcleos sensitivos ventrais desaferentados ou das unidades reticulolâminas inespecíficas desaferentadas. Esse tipo de dor acontece tardiamente a patologia causadora da lesão central. A dor se estende pelas áreas onde houve comprometimento sensitivo (BARON et al., 2017). Nas neuropatias periféricas, as lesões nos nervos periféricos podem levar a produção de potenciais ectópicos nos axônios, e também, a secreção de substâncias que excitam os nociceptores. Em casos de desmielinização dos nervos, fibras com diferentes funções podem estabelecer conexões com nociceptores e com estímulos não dolorosos são interpretados como dolorosos. Nesses casos de neuropatias periféricas podem ocorrer alterações no corno dorsal da medula espinal acarretando uma hiperatividade espontânea e liberação anormal de neurotransmissores, levando ao desequilíbrio da atividade neuronal da medula espinal. As neuropatias podem ser classificadas em mononeuropatias, quando afetam apenas um nervo e estão localizadas no dermatomo do nervo comprometido, ou polineuropatias, quando ocorre na periferia e tem distribuição em bota ou luva (COHEN; MAO, 2014).

As neuropatias podem ser classificadas de acordo com sua etiologia e localização. O trabalho de Hall (2008) mostrou que a incidência de neuralgia pós-herpes é de 28,2/100.000 pessoas ao ano, de neuropatia trigeminal é 27,3/ 100.000 pessoas ao ano e de neuropatia diabética é de 27,2/100.000 pessoas ao ano no Reino Unido. A incidência de dor pós herpes

está diminuindo, ao passo que, a neuropatia diabética e trigeminal permanecem constantes no Reino Unido. O tratamento inicial mais frequente para casos de neuropatia diabética e neuropatia trigeminal é a carbamazepina, medicamento antiepilético associados a um analgésico. Entretanto é muito difícil encontrar um tratamento que alivia a dor e normalize o limiar do paciente (HALL; CARROLL; MCQUAY, 2008).

Figura 1- Classificação da dor



Fonte: Autoria própria

1.3. NEURALGIA TRIGEMINAL

A neuralgia do trigêmeo é uma mononeuropatia que ocorre devido ao comprometimento do nervo de trigêmeo, apresenta uma prevalência de 4,3 pessoas por 100.000 habitantes, sendo mais prevalente em mulheres, 5,7 pessoas por 100.000 habitantes, em homens a prevalência é de apenas 2,5 pessoas por 100.000 habitantes (POSSO; PALMEIRA; VIEIRA, 2016). Na maioria dos casos essa neuralgia é unilateral, afetando apenas um dos ramos do nervo trigêmeo. É descrita como dor lancinante, abrangendo metade da face e podendo durar alguns segundos e, ser desencadeada por estímulos como o vento, escovar os dentes, alimentar-se ou mesmo tocar a face, atingindo diretamente a qualidade de vida dos indivíduos afetados. A dor pode ser referida como choque, pontada ou agulhada e, de tão forte intensidade que muitos pacientes procuram auxílio médico hospitalar com urgência (MAARBJERG et al., 2014). Diferentes fatores podem levar a neuralgia do trigêmeo por provocar lesões do nervo como degeneração ou compressão mecânica (BENOLIEL; TEICH; ELIAV, 2016; ZAKRZEWSKA, 2013).

O Nervo trigêmeo (V) é um nervo craniano misto que se divide em três porções V1 (ou oftálmico), V2 (ou maxilar) e V3 (ou mandibular). Suas vias sensitivas formam o gânglio trigeminal, localizado em uma fossa na face interna da parte petrosa do temporal. As vias sensitivas do trigêmeo são sensíveis a estímulos do tato, dor e temperatura (TORTORA, 2007). Dentre as neuralgias cranianas a neuralgia trigeminal é a mais frequente. Pode ser classificada como neuropatia trigeminal clássica ou dolorosa (figura 1). A neuropatia trigeminal clássica pode ser caracterizada como uma dor persistente e com ataques em um dos ramos trigeminais ou paradoxais. Geralmente é unilateral e acomete apenas um dos ramos do nervo trigêmeo. A neuralgia trigeminal acomete mais mulheres e idosos e, na maioria dos casos, ocorre no ramo maxilar e mandibular (CHESHIRE, 2015; TEPPER, 2018). Na neuralgia trigeminal clássica ocorre a desmielinização das vias aferentes primárias do nervo trigêmeo. Em 91% dos casos de neuralgia trigeminal os pacientes apresentam reações dolorosas a mastigação, toque, ao escovar os dentes, comer, falar e ao vento frio na face. A neuropatia trigeminal dolorosa é causada por causas secundárias como infecção por herpes zoster, esclerose múltipla e também pode ser atribuída a pós-traumas. A infecção por herpes zoster pode causar neuropatia por infecção agudas ou após a infecção. Sua fisiopatologia está associada com o processo inflamatório que causa a desmielinização do nervo trigêmeo, ocorre com maior frequência no ramo oftálmico do trigêmeo e acomete indivíduos imunodeficientes. Em casos de esclerose múltipla pode ocorrer desmielinização do nervo trigêmeo, a neuralgia trigeminal têm prevalência de 1,5% a 7,9%

nesses pacientes e, geralmente, ocorre após 12 anos da estabilização da doença e pode causar uma dor bilateral (MAARBJERG et al., 2017).

A dor neuropática causada por eventos traumáticos, como cirurgias odontológicas, está relacionada, em um momento inicial, a resposta inflamatória e, posteriormente a desmielização e formação de neuroma, dependendo do grau da lesão (TEPPER, 2018). Outra etiologia comum é a compressão vascular, que provoca o mesmo processo fisiopatológico (LORENZONI; DAVID; LEVIVIER, 2012). Estudos veem apontando o envolvimento do estresse do retículo endoplasmático em situações de dor orofacial causada por inflamação regional na doença periodontal e resposta inflamatória induzida por Adjuvante Complemento de Freud (TRINDADE-DA-SILVA et al., 2017; YANG et al., 2014).

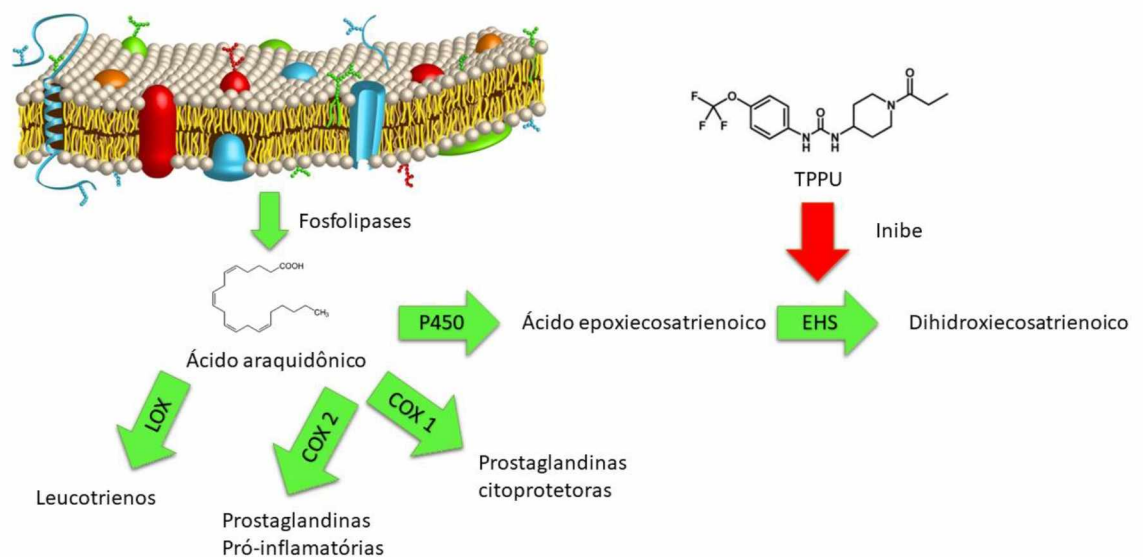
1.4. ESTRESSE DO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO

O estresse do retículo endoplasmático vem demonstrando sua importância quanto a fisiopatologia de neuropatias. O estudo de Zhang 2015 mostrou a ativação do estresse do retículo endoplasmático em ratos após cirurgia de ligação dos nervos da L5 da medula espinal (ZHANG et al., 2015). Outros estudos apontam o envolvimento da atividade do retículo endoplasmático na neuropatia diabética e dores inflamatórias (INCEOGLU et al., 2015; YANG et al., 2014). O estresse do retículo endoplasmático causa o aumento de proteínas desdobradas em seu interior, provocando a produção de algumas citocinas pró-inflamatórias, e também, a ativação da GSK-3, que demonstrou ser importante para vias inflamatórias. A GSK-3 regula a atividade das proteínas IRE1, PERK e ATF6 que, por sua vez, ativam NFκB e leva a produção de IL-1β, TNFα e IL-6. A IRE1 ativa XBP1 que tem função de promover o *splicing* do mRNA, e sua subunidade α tem a capacidade de autofosforilar e promover o recrutamento de chaperonas para o retículo endoplasmático, regulando a atividade da XBP1. A PERK fosforila a subunidade α do eIF-2 que, por sua vez, evita o influxo proteico para o retículo endoplasmático e também aumenta a síntese de mRNA e com o tempo leva a ativação de ATF4 que é convertida em ATF6. A ATF6 tem a função de fazer a proteólise (INCEOGLU et al., 2017; KIM et al., 2015).

Estudos sugerem que a inibição da enzima epóxido hidrolase solúvel é capaz de inibir a ativação do estresse do retículo endoplasmático, e devido a isso, possui efeito anti-inflamatório e antinociceptivo (INCEOGLU et al., 2012, 2017). A enzima epóxi hidrolase solúvel é uma enzima que faz parte da via de degradação do ácido araquidônico (AA) do citocromo P 450 (SPECTOR; KIM, 2015). A via de degradação do AA é uma via de grande importância para os

mecanismos de inflamação e nocicepção (RANG et al., 2011). O ácido araquidônico (AA) é um fosfolípido constituinte da membrana plasmática, com a ação de fosfolipases, principalmente a fosfolipase A2. O AA se desprende da membrana plasmática e fica livre no citoplasma onde é degradado e dá origem aos eicosanoides (LEHNINGER; NELSON, 2006). Há três vias principais para degradação do AA, que são: a via das cicloxigenases (COX), das lipoxigenases (LOX) e do citocromo P450 epoxigenase (figura 2). Existem duas isoformas da COX, a COX1, envolvida com a produção de prostaglandinas com funções citoprotetoras, e a COX2 envolvida com a produção de prostaglandinas pró-inflamatórias. A LOX catalisa reações formadoras de leucotrienos, que são agentes pró-inflamatórios. O citocromo P450 catalisa as reações que dão origem aos ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs), que são rapidamente convertidos em ácidos dihidroxieicosatrienoicos (DHET) pela ação da enzima epóxido hidrolase solúvel (EHS) (SILVA, 2016).

Figura 2- Metabolismo do ácido araquidônico e atuação do TPPU.



Fonte: Autoria própria

O 1-trifluorometoxi fenil-3-(1propionil piperidina-4)-ureia (TPPU) é um inibidor da EHS que demonstrou efeitos antinociceptivos em modelo de neuropatia diabética (INCEOGLU et al., 2015), efeito anti-inflamatório (TRINDADE-DA-SILVA et al., 2017), efeito cardioprotetor após infarto (GUO et al., 2018), efeito neuroprotetor em modelo de doença de Parkinson (REN et al., 2018) e redução da reabsorção óssea na doença periodontal (NAPIMOGA et al., 2018). O TPPU é uma droga de boa absorção intestinal e pode ser administrada via gavagem diluída com PEG400, e causa aumento dos níveis séricos EETs

(GUO et al., 2018; OSTERMANN et al., 2015). Desta forma, a hipótese do presente projeto é de que a inibição da enzima epóxido hidrolase com TPPU previna o estresse do retículo endoplasmático e estabilize as concentrações de EETs diminuindo a dor resultante da neuropatia trigeminal.

2. JUSTIFICATIVA

A neuralgia do trigêmeo é um distúrbio neuropático do nervo do trigêmeo que causa episódios recorrentes de dor intensa e súbita, descrita como dor em choque ou pontadas, tendo como a área mais comumente atingida o maxilar. Uma vez instalada, atividades comuns do dia-a-dia como escovar os dentes, falar, alimentar-se e sorrir podem resultar em episódios de dor intensa, afetando diretamente a qualidade de vida dos indivíduos comprometidos. Um fator agravante dessa patologia é a dificuldade de tratamento. O tratamento farmacológico pode não ser eficaz, muitas vezes é necessário a alteração do tratamento após adaptação que resulta na ineficácia do tratamento após um certo tempo, e possui efeitos adversos. Como primeira opção de tratamento farmacológico é utilizado doses baixas de carbamazepina, e com o tempo é necessário o aumento da dose e redução do tempo entre uma dose e outra, como segunda opção há o tratamento com oxcarbazepina (CHESHIRE, 2015). E em última opção há a utilização de procedimentos médicos como descompressão vascular, para casos onde a neuralgia trigeminal é causada pela compressão vascular, terapia de irradiação do nervo por *gamma knife* (KARAM et al., 2014) e o método de microcompressão percutânea com balão (RUSCHEL et al., 2017) mesmo com métodos mais invasivos, os sintomas da neuralgia podem retornar após algum tempo. Considerando o custo benefício, a adoção de um tratamento farmacológico eficaz e que perdure por mais tempo seria o mais conveniente. A realização desse estudo permitiria avançar no entendimento dos mecanismos envolvidos na indução ou manutenção da dor nesta condição, assim como identificar um novo alvo terapêutico mais eficaz e seguro em relação aos existentes.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o possível efeito antinociceptivo do inibidor da Enzima Epóxido Hidrolase Solúvel, o 1-trifluorometoxy fenil-3-(1propionil piperidina-4)-ureia (TPPU) em modelo de neuralgia do trigêmeo em camundongos.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar o modelo de neuralgia trigeminal em camundongos;
- Avaliar a eficácia do TPPU para tratamento de neuralgia do trigêmeo em camundongos.

4. METODOLOGIA

4.1. ANIMAIS

Para realizar o estudo foram utilizados camundongos C57BL/6J machos de seis a oito semanas de idade (pesando aproximadamente 20 g), provenientes do biotério Central da Universidade Federal de Uberlândia campus Umuarama. Todos os animais foram mantidos no biotério sob condições de temperatura (23-25 °C) e ciclo claro/escuro de 12 h, com livre acesso à ração e água. Foi fornecido enriquecimento do meio na forma de bolas de papel toalha para confecção do ninho. A condução dos experimentos com animais condizia com as normas do Comitê de Ética para o uso de Animais de Experimentação da UFU (protocolo 117/16- conforme anexo I) e normas recomendadas pela IASP (ZIMMERMANN, 1983).

4.2. DESIGN EXPERIMENTAL

O design experimental (figura 3) foi baseado nos trabalhos de TREVISAN et al., 2016 e VOS; STRASSMAN; MACIEWICZ, 1994. O período de experimentação foi dividido em três momentos: período de ambientação, cirurgico e pós-cirúrgico. O dia da cirurgia foi considerado o dia zero.

Figura 3- Design experimental.

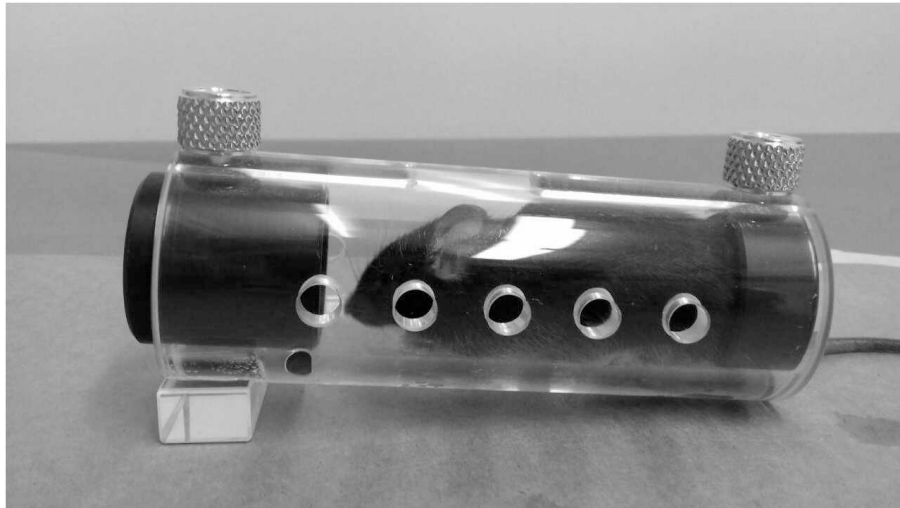


Fonte: Autoria própria

O experimento teve duração total de 24 dias. Os três primeiros dias eram o período de ambientação com a sala de experimentação e com as caixas de contenção, utilizadas para limitar a mobilidade dos animais durante a análise do limiar mecânico e permitir o contato do

experimentador com a face do animal (figura 4). Nesse período os animais permaneceram na sala por uma hora/dia e depois foram colocados nas caixas de contenção, onde permaneceram por trinta minutos antes de serem devolvidos a caixa. No terceiro dia, além da ambientação, foi avaliado o limiar mecânico dos animais.

Figura 4 –Caixa de contenção.



Fonte: Autoria própria

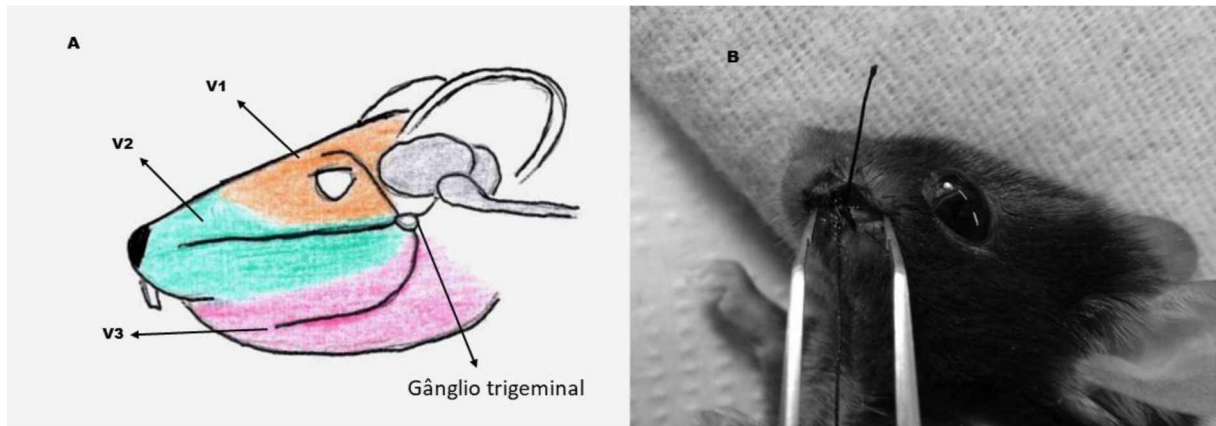
O dia da cirurgia de constrição do nervo infraorbital foi considerado o dia zero, pois é quando o processo patológico de neuralgia do trigêmeo se inicia. No período pós-cirúrgico foram feitas avaliações comportamentais e tratamento. As avaliações comportamentais foram realizadas nos dias 3, 7, 10, 15 e 20 após a cirurgia. Nesses dias os animais passaram por uma ambientação de trinta minutos na sala de experimentação, e mais quinze minutos nas caixas de contenção, e então foram feitas as medidas.

4.3. CIRURGIA DE CONSTRIÇÃO DO NERVO INFRAORBITAL

Como modelo de neuropatia do trigêmeo foi realizado a constrição do nervo infraorbital dos animais. Primeiramente, os camundongos eram anestesiados através de injeção intraperitoneal de cetamina: xilazina (na dose de 100:10 mg/kg) e então tricotomizados na região vibrissal. Em seguida, foi feita uma incisão acima do lábio superior direito lateral ao nariz expondo o nervo infraorbital, e então, duas amarras (fio cirúrgico5) foram feitas em torno do nervo infraorbital com uma distância média de 2 mm (figura 5) (TREVISAN et al., 2016; VOS; STRASSMAN; MACIEWICZ, 1994). Animais falso-operados (sham) foram submetidos ao mesmo procedimento, porém sem realização da amarra do nervo infraorbital. Após a cirurgia

os animais foram avaliados quanto ao desenvolvimento de dor em diferentes tempos após a cirurgia, conforme citado anteriormente.

Figura 5- Amarras no nervo infraorbital de um camundongo. A) Ramificações do nervo trigêmeo em camundongos. **B)** Amarras com fio cirúrgico no nervo infraorbital de camundongo, localizado no ramo V2.



Fonte: Autoria própria

4.4. TRATAMENTOS

Os animais foram divididos em: grupo naïve (n=3), sham (n=4), CION (n=5), tratado com o TPPU (n=6) e tratado com veículo (PEG400) (n=3). O tratamento foi feito na dose de 3 mg/kg (INCEOGLU et al., 2012) administrado por gavagem (via oral), uma vez ao dia, a partir do terceiro dia após a cirurgia, até o término das medidas.

4.5. TESTES COMPORTAMENTAIS

Para avaliação do limiar mecânico foi aplicado um estímulo com os filamentos de Von Frey na região vibrissal do lado direito da face do animal (ipsilateral a cirurgia) onde o filamento era pressionado até apresentar uma leve curvatura e, assim, mantido por um segundo. Foi utilizado o modelo “*up and down*”, onde primeiramente o estímulo mecânico era aplicado utilizando o filamento de 0,16g. Quando havia resposta nociceptiva (*grooming* facial ipsilateral, resposta extremamente agressiva) era utilizado o próximo filamento menor da sequência, e quando não havia resposta nociceptiva era testado o próximo filamento maior da sequência. O limiar do animal é o menor filamento capaz de gerar resposta nociceptiva (VOS; STRASSMAN; MACIEWICZ, 1994). Para isso os animais foram colocados em caixas de contenção (Figura 4), feitas de acrílico e de formato cilíndrico com aberturas laterais para entrada de ar e acesso dos filamentos de Von Frey à face do animal. Para tanto, os animais foram ambientados nas caixas de contenção, conforme descrito anteriormente.

Avaliação da resposta espontânea foi feita em caixas elevadas com fundo de tela e após uma hora de ambientação com o aparato foi avaliado o *grooming* facial durante 15 minutos. A avaliação da sensibilidade térmica ao frio foi feita após a aplicação de 20 μ L de acetona na região das vibrissas ipsilateral a cirurgia utilizando uma seringa de insulina com adaptações, sem que a mesma tocasse a face do animal. Após a aplicação tópica da acetona os animais foram colocados em uma caixa de acrílico e foi cronometrado o tempo de *grooming* facial feito até 5 minutos após o estímulo. O *grooming* facial se trata do ato de esfregar as patas na região da face.

4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com auxílio dos softwares Excel 2016, Bioestat 5.0 e GraphPad prism 5. Foi realizado o teste de normalidade de Shapiro Wilk considerando o valor de $\alpha=0,05$. Em seguida foi aplicado o teste de probabilidade para dados não paramétricos o teste de Kruskal-Wallis com teste pos hoc de Student Newman Keuls ou teste de Mann-Whitney, para todos foram considerados o valor de $\alpha=0,05$. Os resultados foram descritos em mediana e média $\pm$ Erro padrão.

5. RESULTADOS

5.1- CIRURGIA DE CONSTRIÇÃO DO NERVO TRIGEMINAL CAUSA REDUÇÃO DO LIMAR MECÂNICO.

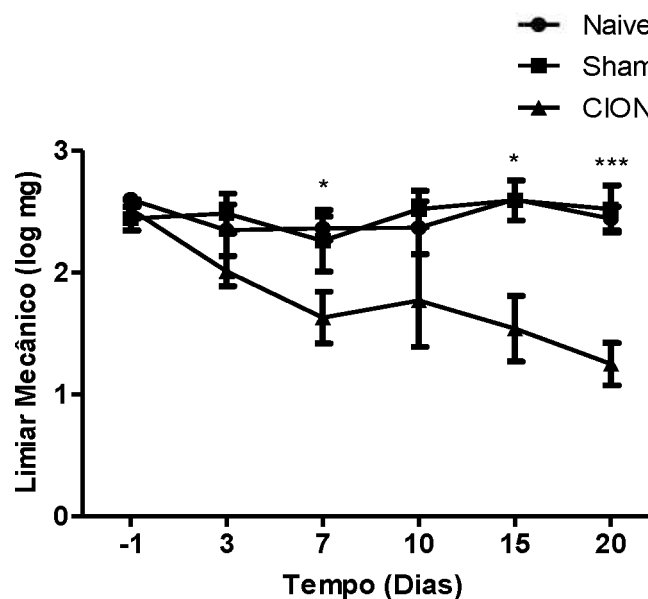
Para avaliar o limiar mecânico os animais foram colocados em caixas de contenção para viabilizar o estímulo mecânicos da região vibrissal ipsilateral a cirurgia com os filamentos. A pressão feita por cada filamento foi dada em gramas e o resultado expresso em média $\pm$ erro padrão e mediana e aplicado o teste de Kruskal Wallis com teste pós hoc de Student Newman Keuls comparando a variação das medidas dos grupos ao longo dos dias considerando $\alpha=0,05$ (tabela 1). Os animais que foram submetidos a CION apresentaram redução significativa do limiar mecânico nos dias 7 ($p=0,014$), 15 ($p=0,011$) e 20 ($p=0,001$) após a CION quando comparados com sua medida basal, não houve diferença estatisticamente significativa entre o limiar mecânico basal e do dia 3 após a CION. Os animais Naive e Sham, que foram submetidos aos mesmos procedimentos (exceto cirúrgico), não apresentaram comportamento semelhante ao grupo CION, pois não houve diferença estatisticamente significativa entre as medidas após o dia da cirurgia com a medida basal (naive $p=0,826$; sham $p=0,931$) (gráfico 1).

Tabela 1- Avaliação do limiar mecânico para padronização do modelo de neuralgia do trigêmeo.

	NAIVE (N=3)		SHAM (N=4)		CION (N=5)	
	Mediana	Média ± Erro Padrão	Mediana	Média ± Erro Padrão	Mediana	Média ± Erro Padrão
BASAL (DIA -1)	0,4	0,4± 0	0,4	0,3±0,06	0,4	0,35±0,05
DIA 3	0,4	0,33± 0,12	0,4	0,37±0,09	0,16	0,12±0,03
DIA 7	0,16	0,26± 0,06	0,4	0,28±0,08	0,04	0,06±0,03
DIA 10	0,4	0,35± 0,12	0,4	0,42±0,15	0,07	0,12±0,09
DIA 15	0,4	0,40±0	0,6	0,5±0,16	0,07	0,06±0,03
DIA 20	0,4	0,31±0,06	0,16	0,5±0,21	0,02	0,03±0,01
VALOR DE P		0,826		0,931		0,021

Nota: limiar mecânico dado em gramas, teste de Kruskal-Wallis adotando significância para valores de $p \leq 0,05$.

Gráfico 1- Curva do limiar mecânico em função do tempo de experimento para padronização do modelo de neuralgia do trigêmeo. Resultados expressos em média ± erro padrão. * $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,005$.



Fonte: Autoria própria

5.2. A CION NÃO CAUSOU ALTERAÇÕES NO COMPORTAMENTO ESPONTÂNEO E NA RESPOSTA A ESTÍMULOS FRIO.

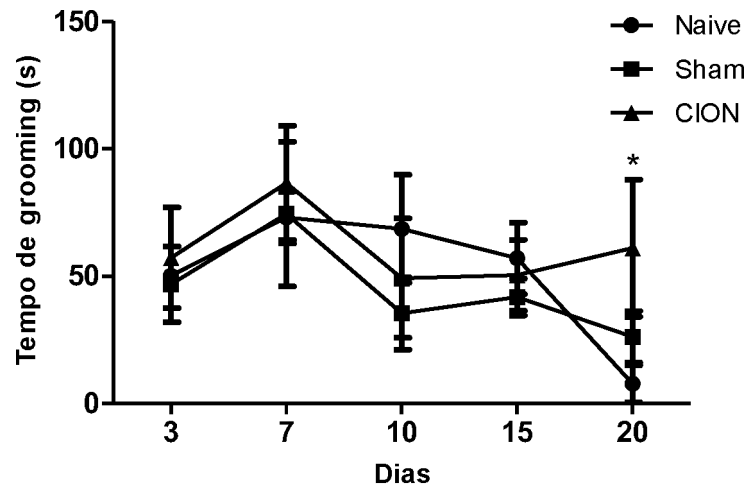
Para avaliar o comportamento espontâneo os animais foram colocados em gaiolas suspensas com fundo de grade e após o período de ambientação foi avaliado o tempo (dado em segundos) gasto com o comportamento de *grooming* da região facial durante 15 minutos, o resultado foi expresso em média $\pm$ erro padrão (gráfico 2). O gráfico 2 mostra o tempo gasto com o *grooming* facial dos animais de cada grupo, o teste estatístico aplicado foi o teste de Kruskal Wallis com teste pos hoc de Student Newman Keuls comparando a diferença entre o desempenho dos grupos para cada dia e considerando $\alpha=0,05$. Foi observado diferença estatística apenas no vigésimo dia após o procedimento cirúrgico ($p=0,034$) o teste pos hoc apontou diferença entre os grupos naive e CION ($p=0,011$), não houve diferença significativa com a comparação dos grupos naive e sham ($p=0,09$) e sham e CION ($p=0,396$) (tabela 2).

Tabela 2- Avaliação da resposta espontânea para padronização do modelo de neuralgia do trigêmeo.

GRUPO	PARÂMETROS	DIA 3	DIA 7	DIA 10	DIA 15	DIA 20
NAIVE (N=3)	Mediana	50	74	57	68	1
	Média $\pm$ erro	50,2 $\pm$ 2,9	73 $\pm$ 10,2	68,6 $\pm$ 21,2	57 $\pm$ 14,1	7,8 $\pm$ 7,3
SHAM (N=4)	Mediana	66	43	19	38	17
	Média $\pm$ erro	46,8 $\pm$ 14,9	74,4 $\pm$ 28,5	35,4 $\pm$ 14,3	41,8 $\pm$ 7,3	26,2 $\pm$ 10,1
CION (N=5)	Mediana	66	73	30	63	42
	Média $\pm$ erro	57,2 $\pm$ 19,7	86,6 $\pm$ 22,4	49,2 $\pm$ 23,4	50,4 $\pm$ 14	61 $\pm$ 26,9
VALOR DE P		0,79	0,93	0,64	0,25	0,034

Nota: resultados expressos em mediana e média $\pm$ erro padrão do tempo de *grooming* facial não evocado (dado em segundos), e teste de Kruskal- Wallis considerando significância para valores de $p \leq 0,05$.

Gráfico 2- Curva do tempo de *grooming* facial em função do tempo de experimento para padronização do modelo de neuralgia trigeminal. * $p \leq 0,05$.

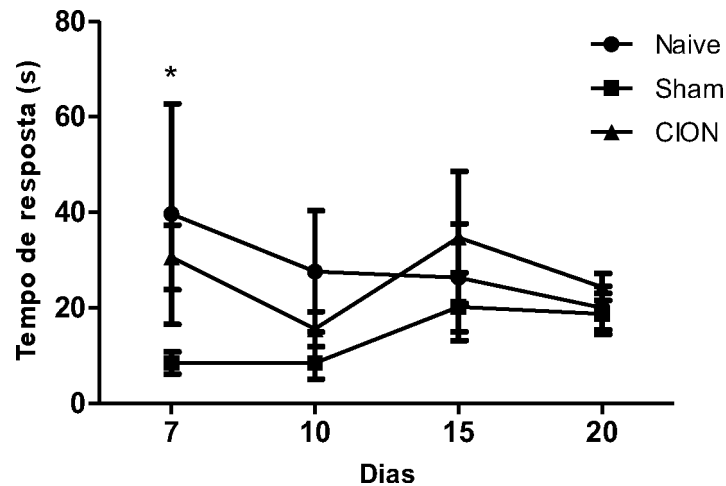


Fonte: Autoria própria

O teste de sensibilidade térmica utilizado foi o teste de aplicação tópica de 20 μ L de acetona na região vibrissal ipsilateral a cirurgia e avaliação do tempo de *grooming* (dado em segundos) facial do animal por cinco minutos, resultados foram descritos como média $\pm$ erro padrão e analisados pelo teste estatístico de Kruskal Wallis com teste pos hoc de Student Newman Keuls comparando o desempenho dos três grupos para cada dia (gráfico 3). O gráfico 3 mostra o tempo que cada animal dedicou para o *grooming* facial após a aplicação tópica de acetona. Foi observado diferença estatisticamente significativa entre o desempenho dos animais no sétimo dia após a cirurgia ($p=0,045$), o teste pos hoc apontou diferença significativa quando foi feita a comparação do grupo Naive e sham ($p=0,02$), entretanto não houve significância quando os grupos naive e CION ($p=0,671$) e sham e CION ($p=0,056$) foram comparados (tabela 3).

Após obter tais resultados com os testes de comportamento espontâneo, resposta a estímulo térmico e limiar mecânico foi dada continuidade do trabalho utilizando apenas a avaliação do limiar mecânico dos animais, devido aos resultados dos testes de comportamento espontâneo e resposta a estímulo frio não serem representativos e não estarem de acordo com resultados relatados na literatura (TREVISAN et al., 2016; VOS; STRASSMAN; MACIEWICZ, 1994).

Gráfico 3- Curva do tempo de resposta ao estímulo frio em função do tempo de experimento. * $p \leq 0,05$.



Fonte: Autoria própria

Tabela 3- Avaliação da resposta ao estímulo frio para padronização do modelo de neuralgia do trigêmeo.

GRUPO	PARÂMETRO	DIA 7	DIA 10	DIA 15	DIA 20
NAIVE (N=3)	Mediana	39	17	91	17
	Média± Erro padrão	39,7±23,1	27,7±12,7	26,7±11,3	20±4,6
SHAM (N=4)	Mediana	9,5	7	20,5	18,5
	Média± Erro Padrão	8,5±2,3	8,5±3,4	20,25±7,1	18,75±4,3
CION (N=5)	Mediana	29	13	27	22
	Média± Erro Padrão	30,6±6,8	15,6±3,6	34,8±13,9	24,4±2,8
VALOR DE P		0,045	0,06	0,46	0,16

Nota: Resultados expressos pela mediana e média ± erro padrão do tempo de *grooming* facial (em segundos) evocado por estímulo frio, e teste de Kruskal- Wallis considerando significância para valores de $p \leq 0,05$.

5.3. EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA INIBIÇÃO DA EHS.

O tratamento com TPPU, inibidor de EHS, foi iniciado no terceiro dia após a CION. A primeira dose foi administrada após a avaliação do limiar basal do dia, e em seguida foi aferido o limiar mecânico após 30 minutos, uma, duas, quatro, seis e 24 horas. Os resultados foram representados como média ± erro padrão e aplicando o teste de Mann Whitney. Analisando a

curva de analgesia após a primeira dose de TPPU é possível observar que após uma hora do tratamento é possível observar o aumento do limiar mecânico dos animais tratados ($p=0,004$), o que também é observado após 24 horas após o primeiro tratamento ($p=0,037$), nos demais horários não foram observadas alterações estatisticamente significantes no limiar mecânico (gráfico 4-B; tabela 4).

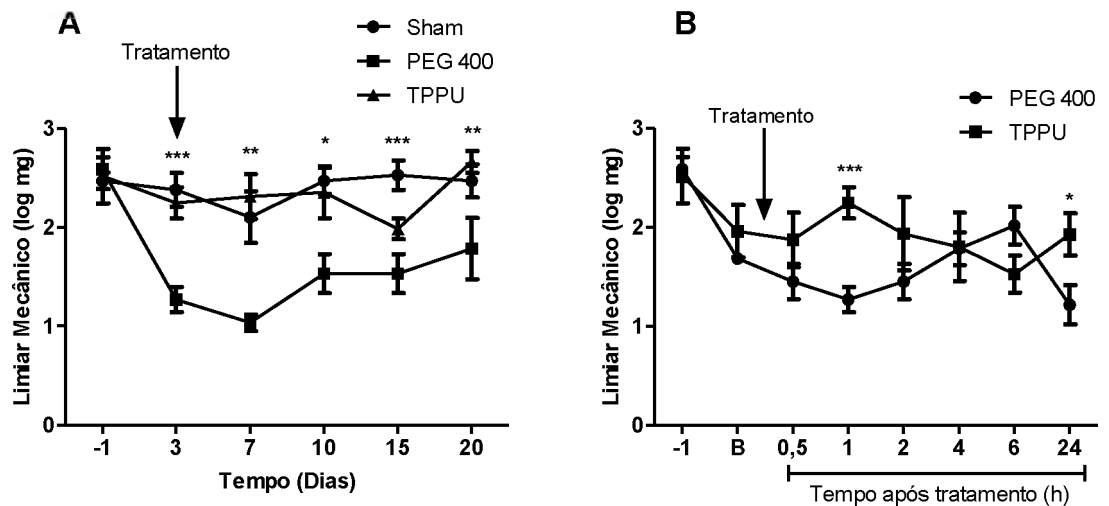
A avaliação do limiar mecânico durante o período de tratamento diário foi feito após uma hora do tratamento do dia de mensuração, os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão e aplicado o teste de Kruskal Wallis e teste pos hoc de Student Newman Keuls comparando a variação do desempenho dos grupos ao longo dos dias (tabela 5). Foi observado que houve diferença estatisticamente significativa em todos os dias de tratamento, nos dias 3 ($p=0,003$), 7 ($p=0,006$), 10 ($p=0,016$), 15 ($p=0,004$) e 20 ($p=0,038$) (gráfico 4-A).

Tabela 4- Efeito da dose única do TPPU sobre o limiar mecânico dos animais submetidos a CION.

	PEG 400 (N=3)		TPPU (N=6)		VALOR DE
	Mediana	Média $\pm$ Erro Padrão	Mediana	Média $\pm$ Erro Padrão	P
DIA -1	0,6	0,45 $\pm$ 0,093	0,7	0,597 $\pm$ 0,187	0,631
BASAL	0,04	0,05 $\pm$ 0,073	0,115	0,180 $\pm$ 0,073	0,262
30 MIN	0,04	0,039 $\pm$ 0,011	0,115	0,170 $\pm$ 0,090	0,200
1 H	0,02	0,023 $\pm$ 0,006	0,16	0,243 $\pm$ 0,087	0,004
2 H	0,04	0,039 $\pm$ 0,011	0,115	0,341 $\pm$ 0,220	0,262
4 H	0,07	0,083 $\pm$ 0,026	0,055	0,221 $\pm$ 0,120	0,873
6 H	0,07	0,17 $\pm$ 0,073	0,03	0,053 $\pm$ 0,023	0,109
24 H	0,008	0,029 $\pm$ 0,013	0,16	0,120 $\pm$ 0,027	0,037

Nota: Resultados expressos pela mediana e média $\pm$ erro padrão do limiar mecânico (dado em gramas), e teste de Mann-Whitney considerando significância para valores de $p \leq 0,05$.

Gráfico 4- Efeito analgésico do tratamento com TPPU- A) Curva de variação do limiar mecânico em função do tempo durante o tratamento diário. B) Curva de variação do limiar mecânico em função do tempo após a primeira dose do tratamento. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; * $p \leq 0,005$.**



Fonte: Autoria própria

Tabela 5- Teste pos hoc de Student Newman Keuls para a avaliação do limiar mecânico durante o tratamento diário.

EQUIPARADOS	DIA 3	DIA 7	DIA 10	DIA 15	DIA 20
PEG400 X TPPU	0,006	0,003	0,019	0,150	0,013
PEG400 X SHAM	0,002	0,016	0,012	0,002	0,28
SHAM X TPPU	0,746	0,589	0,87	0,084	0,15

Nota: significância estatísticas para valores de $p \leq 0,05$.

6. DISCUSSÃO

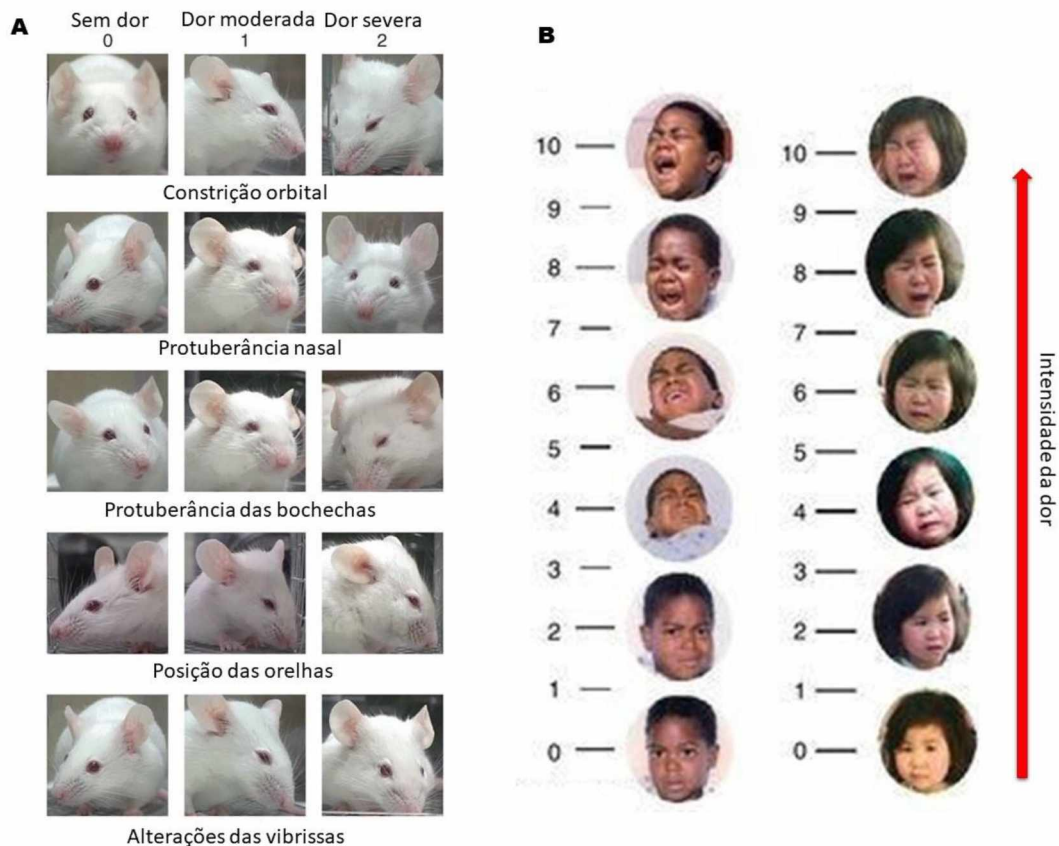
Em humanos a Neuropatia trigeminal é, na maioria das vezes, associada a infecção de herpes, e também a constrição vascular. O modelo utilizado pode ser comparado com a neuropatia trigeminal que ocorre devido a constrição do nervo por vasos e também a lesão pós cirurgia odontológica, pois possuem etiologia semelhantes que podem dar início aos mesmos processos fisiopatológicos ocasionados pela compressão mecânica do nervo e os processos inflamatórios devido a lesão tecidual no local e o a injúria do nervo. Estudos anteriores mostram que assim como a patologia em humanos os animais submetidos a CION apresentam dor unilateral e no ramo trigeminal acometido, no caso o ramo V2, e redução do limiar mecânico e térmico, seja ele por estímulo frio ou quente.

O presente estudo mostrou que, assim como em outros estudos, há redução do limiar mecânico dos animais submetidos a CION (gráfico 1), entretanto, o teste aplicado para avaliar o limiar térmico não foi fidedigno com o encontrado na literatura. No estudo de Trevisan e colaboradores (2016), o qual utilizou a mesma metodologia que o presente estudo, mostrou que os animais submetidos a CION gastaram mais tempo com o *grooming* facial após aplicação tópica de acetona quando comparados com os animais do grupo controle. Em nossas condições laboratoriais tal metodologia não trouxe o resultado esperado para avaliar o limiar térmico (gráfico 3), mas outras metodologias para avaliar o limiar térmico poderiam ainda ser exploradas, conforme sugere a literatura. Chichoro e colaboradores (2006) avaliou a sensibilidade térmica no mesmo modelo de neuralgia aplicando o spray de tetrafluoroetano por trinta segundos para mimetizar estímulos frios e em seguida avaliou o *grooming* facial durante dois minutos. Assim como Chichoro, Theodoro e colaboradores (2013) e Kopruszins e colaboradores (2012), observaram que os animais submetidos a CION apresentam aumento do tempo de *grooming* facial, mas para tais estudos foram utilizados ratos. Lyons e colaboradores (2015) fez uma adaptação da metodologia de Neubert e colaboradores (2005), e utilizou um bastão metálico para aplicar os estímulos térmicos na região V2 dos animais, a temperatura do bastão era ajustada e com isso ele a utilizava para aplicar estímulos frio e quente. O trabalho de Luiz e colaboradores (2015) avaliou o limiar térmico utilizando estímulo quentes, posicionando uma fonte de calor irradiada a um cm de distância da região vibrissal e o tempo que o animal demorava para ter o reflexo de retirar a cabeça ou a retração facial.

A avaliação da resposta espontânea foi outro parâmetro avaliado com a mesma metodologia de Trevisan e colaboradores (2016) e que não apresentou os mesmos resultados no presente estudo. Trevisan observou que os animais submetidos a CION gastaram mais tempo

realizando o *grooming* facial mesmo sem aplicação de estímulo, nossas condições laboratoriais não corroboram para obtenção de resultado semelhante com tal metodologia (gráfico 2). Há ainda outras formas de avaliar o comportamento espontâneo nociceptivo. É possível avaliar a expressão facial, piloereção, perda de peso e a postura para avaliar se o animal está sentindo dor ou não, Langford e colaboradores 2010 desenvolveu uma escala de expressões faciais de camundongos (MGS- *mouse grimace scale*), onde a expressão facial do animal é avaliada e a dor pode ser classificada em normal, moderada e severa (figura 6-A); Akintola e colaboradores (2017) utilizou a mesma metodologia para avaliar a dor em modelo de neuralgia trigeminal roedores e observou que os animais CION obtiveram score maior que os animais sham. Tal método foi desenvolvido devido a existência de uma metodologia parecida, que é utilizada para avaliar a dor em crianças, sobretudo neonatos e crianças de até um ano, onde é utilizada a escala de expressão facial (figura 6-B) (BIERI et al., 1990).

Figura 6- Escalas de dor. A) Escalas de dor, *Mouse Grimace scale*. B) Escala de Oucher



Fonte: Adaptado de Ramalho (2017) e Langford (2010)

Após observar os resultados da padronização dos experimentos foi dada continuidade ao trabalho utilizando apenas a avaliação do limiar mecânico. Os resultados do tratamento

mostraram que o TPPU tem efeito antinociceptivo após uma hora de sua administração (gráfico 4B). O TPPU é um fármaco de rápida absorção intestinal e é lentamente metabolizado pelo fígado, e o metabolismo de fase II não causa efeito relevante sobre as concentrações de TPPU (OSTERMANN et al., 2015). Ao analisar a curva de analgesia do TPPU é possível observar que após 24 horas os animais tratados possuem limiar mecânico maior que o grupo veículo, isso se deve ao fato de que mesmo após 25 horas da administração o TPPU na dose de 3mg/ kg continua com níveis plasmáticos acima de sua IC50 (LIU et al., 2013). O tempo de metabolismo do TPPU indica que doses menos frequentes são eficazes para o tratamento de neuropatia, e ainda que pode ter a redução da dose e ainda assim obter um bom resultado com o tratamento. Após a curva de analgesia decidimos realizar o teste comportamental após uma hora do tratamento e observamos que o tratamento com TPPU é eficaz a partir da primeira dose e perdura por 17 dias (gráfico 4A). Existem outros inibidores para EHS que podem ter efeito semelhante, como por exemplo o AUDA, TPAU, TUPS que também foram testados para neuropatia diabética e apresentaram efeito antinociceptivo (INCEOGLU et al., 2012).

Um possível mecanismo de ação dos IEHS é a inibição do estresse do retículo endoplasmático que pode estar envolvido na fisiopatologia da dor. Estudos mostram que os IEHS inibem o estresse do retículo endoplasmático em modelos de dor, neuropatia diabética e dor inflamatória (WAGNER et al., 2013). O estresse do retículo endoplasmático pode estar envolvido na fisiopatologia da dor, uma vez que, sua indução causa analgesia, e sua ativação foi detectada em diferentes modelos de dor. A metodologia de indução de neuropatia trigeminal por meio da CION é similar com a metodologia de neuropatia do nervo ciático por ligação do nervo espinhal da L5, e nesse modelo foi observado estresse do retículo endoplasmático com aumento das proteínas ATF6, BIP, eIF2 α no corno dorsal da medula espinhal ipsilateral a lesão (ZHANG et al., 2015).

A constrição de um nervo leva a liberação de algumas citocinas, como TNF α e NF κ B, e também da enzima NOX que leva a ROX, esses fatores causam estresse oxidativo celular, levando a disfunção mitocondrial e o estresse do retículo endoplasmático desregulando, assim, a homeostase celular levando a morte celular, sobretudo de células da glia e consequentemente a desmielinização do nervo (COELHO et al., 2014; ISLAM, 2017; TREVISAN et al., 2016; ZHANG; CHI, 2018). A inibição da enzima EHS causa redução dos níveis de TNF α , NF κ B e NOX e também da COX2 e LOX, podendo ser assim um de seus mecanismos de ação (WAGNER et al., 2017).

A disfunção mitocondrial leva a liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS-*reactive oxygen species*), que por sua vez estimulam o retículo endoplasmático causando seu estresse. A disfunção mitocondrial leva a apoptose e está relacionada com dor, neurodegeneração, diabetes, doenças cardiovasculares e, também, correlacionada com a morte de células do sistema nervoso, como as células da glia. A morte de células da glia causa desmielinização dos nervos, o que ocorre na neuralgia trigeminal, assim como em outras dores crônicas. A desmielinização do nervo leva a comunicações entre as fibras nervosas, e estímulos não nocivos podem ser interpretados como dolorosos devido a uma comunicação de fibras sensitivas com os nociceptores. Os EETs também causam inibição da disfunção mitocondrial, o que pode estar relacionado com um mecanismo para diminuir a desmielinização do nervo, e consequentemente reduzir os sintomas da neuralgia trigeminal. Por isso a disfunção mitocondrial pode ser a chave para a fisiopatologia da neuralgia trigeminal e para tantas outras neuropatias (INCEOGLU et al., 2017).

Entretanto para confirmação de tal teoria são necessários mais estudos, uma vez que o presente trabalho não trouxe nenhum estudo molecular e o n amostral utilizado ainda não é representativo. Tais resultados são apenas indicativos que tais eventos acontecem, mas não os confirmam e mais estudos serão necessários.

7. CONCLUSÃO

O presente estudo indica que animais submetidos a CION apresentam redução do limiar mecânico, e o TPPU possui efeito antinociceptivo em modelo de neuralgia trigeminal em camundongos, após uma hora e 24 horas após a primeira dose, e continua sendo eficaz após 17 dias consecutivos de tratamento. Mais estudos são necessários para consolidar tal achado e para melhor entender o mecanismo de ação do TPPU.

BIBLIOGRAFIA

- A BÍBLIA Sagrada: antigo e novo testamento. Barueri: Sociedade Bíblica do Brasil. 2014
- AKINTOLA, T. et al. The grimace scale reliably assesses chronic pain in a rodent model of trigeminal neuropathic pain. **Neurobiology of Pain**, v. 2, p. 13–17, ago. 2017.
- APKARIAN, V. A. **Functional imaging of pain: new insights regarding the role of the cerebral cortex in human pain perception**. Seminars in Neuroscience. **Anais...** Academic Press, 1995
- BARON, R. et al. Peripheral neuropathic pain: a mechanism-related organizing principle based on sensory profiles. **PAIN**, v. 158, n. 2, p. 261–272, fev. 2017.

BENOLIEL, R.; TEICH, S.; ELIAV, E. Painful Traumatic Trigeminal Neuropathy. **Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America**, v. 28, n. 3, p. 371–380, ago. 2016.

BESSON, J. M.; GUILBAUD, G.; OLLAL, H. Thalamic processing of sensory-discriminative and affective-motivational dimensions of pain. **Forebrain areas involved in pain processing**, p. 63, 1995.

BIERI, D. et al. The faces pain scale for the self-assessment of the severity of pain experienced by children: Development, initial validation, and preliminary investigation for ratio scale properties. **Pain**, v. 41, n. 2, p. 139–150, maio 1990.

BOVOLENTO, D. **O que eu tô fazendo da minha vida?** São Paulo: Planeta do Brasil, 192p. 2018.

CARR, D. B.; GOUDAS, L. C. Acute pain. **Lancet (London, England)**, v. 353, n. 9169, p. 2051–2058, 12 jun. 1999.

CHEN, Y. Chinese values, health and nursing. **Journal of Advanced Nursing**, v. 36, n. 2, p. 270–273, out. 2001.

CHESHIRE, W. P. Cranial Neuralgias. **Continuum (Minneapolis, Minn.)**, v. 21, n. 4 Headache, p. 1072–1085, ago. 2015.

CHICHORRO, J. G. 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, p. 64–74, jul. 2006.

COELHO, S. C. et al. Etanercept reduces thermal and mechanical orofacial hyperalgesia following inflammation and neuropathic injury: Etanercept reduces orofacial hyperalgesia. **European Journal of Pain**, v. 18, n. 7, p. 957–967, ago. 2014.

COHEN, S. P.; MAO, J. Neuropathic pain: mechanisms and their clinical implications. **BMJ**, v. 348, n. feb05 6, p. f7656–f7656, 5 fev. 2014.

CORRAL TUESTA, C. Acute pain treatment in the patient with a substance use disorder. 28 maio 2018.

DALMOLIN, G. D. Efeito hiperalgésico produzido pela administração de bradicinina na amígdala de ratos [s.n.]. p. 86, 2006.

FAGUNDES, R. G. M. Estudo da participação de receptores NMDA dos Gânglios da Raiz Dorsal em modelo de neuropatia por Constrrição Crônica em ratos. p. 41, 2017.

FELLER, L. et al. Burning Mouth Syndrome: Aetiopathogenesis and Principles of Management. **Pain Research & Management**, v. 2017, 2017.

GOLD, M. S.; GEBHART, G. F. Nociceptor sensitization in pain pathogenesis. **Nature medicine**, v. 16, n. 11, p. 1248–1257, nov. 2010.

GUO, Y. et al. TPPU enhanced exercise-induced epoxyeicosatrienoic acid concentrations to exert cardioprotection in mice after myocardial infarction. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 22, n. 3, p. 1489–1500, mar. 2018.

HALL, G. C.; CARROLL, D.; MCQUAY, H. J. Primary care incidence and treatment of four neuropathic pain conditions: A descriptive study, 2002–2005. **BMC Family Practice**, v. 9, p. 26, 6 maio 2008.

INCEOGLU, B. et al. Acute augmentation of epoxygenated fatty acid levels rapidly reduces pain-related behavior in a rat model of type I diabetes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 28, p. 11390–11395, 10 jul. 2012.

INCEOGLU, B. et al. Endoplasmic reticulum stress in the peripheral nervous system is a significant driver of neuropathic pain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 29, p. 9082–9087, 21 jul. 2015.

INCEOGLU, B. et al. Modulation of mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress are key mechanisms for the wide-ranging actions of epoxy fatty acids and soluble epoxide hydrolase inhibitors. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v. 133, p. 68–78, nov. 2017.

ISLAM, M. T. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders. **Neurological Research**, v. 39, n. 1, p. 73–82, 2 jan. 2017.

KARAM, S. D. et al. Trigeminal neuralgia treatment outcomes following Gamma Knife radiosurgery with a minimum 3-year follow-up. **Journal of Radiation Oncology**, v. 3, n. 2, p. 125–130, jun. 2014.

KIM, S. et al. Endoplasmic Reticulum Stress–Induced IRE1 α Activation Mediates Cross-Talk of GSK-3 β and XBP-1 To Regulate Inflammatory Cytokine Production. **The Journal of Immunology**, v. 194, n. 9, p. 4498–4506, 1 maio 2015.

KOPRUSZINSKI, C. M.; REIS, R. C.; CHICHORRO, J. G. B vitamins relieve neuropathic pain behaviors induced by infraorbital nerve constriction in rats. **Life Sciences**, v. 91, n. 23–24, p. 1187–1195, dez. 2012.

KUMAR, K. H.; ELAVARASI, P. Definition of pain and classification of pain disorders. **Journal of Advanced Clinical & Research Insights**, v. 3, p. 87–90, 2016.

LANGFORD, D. J. et al. Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. **Nature Methods**, v. 7, n. 6, p. 447–449, jun. 2010. il color

LARSSON, M.; BROMAN, J. Synaptic organization of VGLUT3 expressing low-threshold mechanosensitive C fiber terminals in the rodent spinal cord. 2018.

LEAL, T. O núcleo tuberomamilar modula a nocicepção e a inflamação periférica via receptor h1 medular. [s.n.] p. 131, 2016.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, K. Y. **Princípios de Bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2006.

LIU, J.-Y. et al. Substituted phenyl groups improve the pharmacokinetic profile and anti-inflammatory effect of urea-based soluble epoxide hydrolase inhibitors in murine models. **European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 4–5, p. 619–627, 12 mar. 2013.

LOESER, J. D.; TREEDE, R.-D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology: **Pain**, v. 137, n. 3, p. 473–477, jul. 2008.

LOPES, J. M. C. **Fisiopatologia da Dor**. Lisboa: Permayer Portugal, 2003.

LORENZONI, J.; DAVID, P.; LEVIVIER, M. Patterns of neurovascular compression in patients with classic trigeminal neuralgia: A high-resolution MRI-based study. **European Journal of Radiology**, v. 81, n. 8, p. 1851–1857, 1 ago. 2012.

LUIZ, A. P. et al. Contribution and interaction of kinin receptors and dynorphin A in a model of trigeminal neuropathic pain in mice. **Neuroscience**, v. 300, p. 189–200, ago. 2015.

LYONS, D. N. et al. Trigeminal Inflammatory Compression (TIC) injury induces chronic facial pain and susceptibility to anxiety-related behaviors. **Neuroscience**, v. 295, p. 126–138, jun. 2015.

MAARBJERG, S. et al. Trigeminal Neuralgia - A Prospective Systematic Study of Clinical Characteristics in 158 Patients. **Headache: The Journal of Head and Face Pain**, v. 54, n. 10, p. 1574–1582, nov. 2014.

MAARBJERG, S. et al. Trigeminal neuralgia - diagnosis and treatment. **Cephalalgia: An International Journal of Headache**, v. 37, n. 7, p. 648–657, jun. 2017.

MERIGHI, A. et al. BDNF as a pain modulator. **Progress in neurobiology**, v. 85, n. 3, p. 297–317, 2008.

MERSKEY, H. Some features of the history of the idea of pain. **Noth Holland Biomedical Press** p. 6, 1980.

MERSKEY, H. Pain Disorder, Hysteria or Somatization? **Pain Research and Management**, v. 9, n. 2, p. 67–71, 2004.

NAPIMOGA, M. H. et al. Soluble epoxide hydrolase inhibitor promotes immunomodulation to inhibit bone resorption. **Journal of Periodontal Research**, v. 53, n. 5, p. 743–749, out. 2018.

NEUBERT, J. K. et al. Use of a novel thermal operant behavioral assay for characterization of orofacial pain sensitivity: **Pain**, v. 116, n. 3, p. 386–395, ago. 2005.

NOSEDA, R.; VILLANUEVA, L. Functional Architecture of Central Pain Pathways: Focus on the Trigemino-vascular System. **Neurobiological Basis of Migraine**, p. 69–90, 2017.

OSTERMANN, A. I. et al. Oral treatment of rodents with soluble epoxide hydrolase inhibitor 1-trifluoromethoxyphenyl-3-(1-propionylpiperidin-4-yl) urea (TPPU): resulting drug levels and modulation of oxylipin pattern. **Prostaglandins & other lipid mediators**, v. 121, n. 0 0, p. 131–137, set. 2015.

POSSO, I. DE P.; PALMEIRA, C. C. DE A.; VIEIRA, É. B. DE M. Epidemiology of neuropathic pain. **Revista Dor**, v. 17, 2016.

RAMALHO, C. E.; BRETAS, P. M. C.; SCHVARTSMAN, C.; REIS, A. G. Sedation and analgesia for procedures in the pediatric emergency room. **Jornal de Pediatria**, v. 93, p 2-18, 2017, il color

RANG, H. P. et al. **Rang e Dale: Farmacologia**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

REN, Q. et al. Soluble epoxide hydrolase plays a key role in the pathogenesis of Parkinson's disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 25, p. E5815–E5823, 19 jun. 2018.

RUSCHEL, L. G. et al. Alternative option for osteogenesis imperfecta and trigeminal neuralgia. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 63, n. 4, p. 307–310, abr. 2017.

SILVA, C. A. T. DA. O Uso terapêutico de mediadores anti-inflamatórios da via do ácido araquidônico. [s.n.] 29 jun. 2016.

SPECTOR, A. A.; KIM, H.-Y. Cytochrome P450 epoxygenase pathway of polyunsaturated fatty acid metabolism. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1851, n. 4, p. 356–365, abr. 2015.

TEODORO, F. C. et al. Peripheral substance P and neurokinin-1 receptors have a role in inflammatory and neuropathic orofacial pain models. **Neuropeptides**, v. 47, n. 3, p. 199–206, jun. 2013.

TEPPER, S. J. Cranial Neuralgias. **Continuum (Minneapolis, Minn.)**, v. 24, n. 4, Headache, p. 1157–1178, ago. 2018.

TEXEIRA, M. J.; FIGUEIRÓ, J. A. B. **Dor: Epidemiologia, fisiopatologia, avaliação, síndormes dolorosas e tratamento**. [s.l.] Grupo Editorial Moreira, 2001.

TORTORA, G. J. **Princípios de anatomia humana**. 10. ed. Rio de Janeiro-RJ: Guanabara Koogan, 2007.

TREEDE, R.-D. The International Association for the Study of Pain definition of pain: as valid in 2018 as in 1979, but in need of regularly updated footnotes. **PAIN Reports**, v. 3, n. 2, p. e643, 2018.

TREVISAN, G. et al. TRPA1 mediates trigeminal neuropathic pain in mice downstream of monocytes/macrophages and oxidative stress. **Brain**, v. 139, n. 5, p. 1361–1377, maio 2016.

TRINDADE-DA-SILVA, C. A. et al. Soluble Epoxide Hydrolase Pharmacological Inhibition Decreases Alveolar Bone Loss by Modulating Host Inflammatory Response, RANK-Related Signaling, Endoplasmic Reticulum Stress, and Apoptosis. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 361, n. 3, p. 408–416, jun. 2017.

UNG, H. et al. Multivariate Classification of Structural MRI Data Detects Chronic Low Back Pain. **Cerebral Cortex**, v. 24, n. 4, p. 1037–1044, 1 abr. 2014.

VARANDAS, C. M. B. **Fisiopatologia da Dor**. [s.l.] Universidade Fernando Pessoa, 2013.

VOS, B. P.; STRASSMAN, A. M.; MACIEWICZ, R. J. Behavioral Evidence of trigeminal neuropathic pain following chronic constriction injury to the Rat's Infraorbital Nerve. v. 14, p. 2708–27723, 1994.

- WAGNER, K. et al. Comparative efficacy of 3 soluble epoxide hydrolase inhibitors in rat neuropathic and inflammatory pain models. **European Journal of Pharmacology**, v. 700, n. 1–3, p. 93–101, jan. 2013.
- WAGNER, K. M. et al. Soluble epoxide hydrolase as a therapeutic target for pain, inflammatory and neurodegenerative diseases. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 180, p. 62–76, dez. 2017.
- WILLIS JR., W. D.; COGGESHALL, R. E. **Sensory mechanism of the spinal cord**. [s.l.] Plenum Press, 1991. v. 2
- YANG, E. S. et al. Involvement of Endoplasmic Reticulum Stress Response in Orofacial Inflammatory Pain. **Experimental Neurobiology**, v. 23, n. 4, p. 372, 2014.
- ZAKRZEWSKA, J. M. Differential diagnosis of facial pain and guidelines for management. **British Journal of Anaesthesia**, v. 111, n. 1, p. 95–104, jul. 2013.
- ZEMEL, L.; BLIER, P. R. Juvenile Fibromyalgia: A Primary Pain, or Pain Processing, Disorder. **Seminars in Pediatric Neurology**, v. 23, n. 3, p. 231–241, 1 ago. 2016.
- ZHANG, E. et al. Endoplasmic reticulum stress impairment in the spinal dorsal horn of a neuropathic pain model. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, set. 2015.
- ZHANG, Y.; CHI, D. Overexpression of SIRT2 Alleviates Neuropathic Pain and Neuroinflammation Through Deacetylation of Transcription Factor Nuclear Factor-Kappa B. **Inflammation**, v. 41, n. 2, p. 569–578, mar. 2018.
- ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals: **Pain**, v. 16, n. 2, p. 109–110, jun. 1983.

**ANEXO I- COMPROVANTE DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA
NO USO DE ANIMAIS DA UFU**



Universidade Federal de Uberlândia

CEUA (Comissão de Ética no Uso de Animais)

Pro-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Fone: Ramal (VoIP) 3423; e-mail: ceua@propp.ufu.br; www.comiteseapropp.ufu.br

COMPROVANTE DE ENTREGA DO
Formulário de Entrega Procedimentos para Uso Científico de Animais
(uso exclusivo da CEUA)

Protocolo nº 117/16 (uso da CEUA)

Data de Entrega 13/09/16 (uso da CEUA)

Rubrica Funcionário

Mariana Fernanda de Oliveira

Observação: Na conclusão do projeto, deverá enviar o Relatório Final do projeto, por e-mail para arquivo da CEUA.