



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ORAL



WANDERSON DA SILVA DOS SANTOS

**Efeito anti-hipernociceptivo orofacial do citral em modelos inflamatórios
agudos e persistentes em ratos**



Ribeirão Preto

2023

WANDERSON DA SILVA DOS SANTOS

**Efeito anti-hipernociceptivo orofacial do citral em modelos inflamatórios
agudos e persistentes em ratos**

VERSÃO ORIGINAL

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Oral.

Área de concentração: Biologia Oral

Orientador: Prof. Dr. Luiz Guilherme de Siqueira Branco

Ribeirão Preto

2023

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Assinatura: _____ Data: __/__/__

Ficha catalográfica

Elaborada pela Biblioteca Central do Campus USP - Ribeirão Preto

Santos, Wanderson da Silva dos

Efeito anti-hipernociceptivo orofacial do citral em modelos inflamatórios agudos e persistentes em ratos. Ribeirão Preto, 2023.

61 p.: il.; 30 cm

Tese (Mestrado em Ciências), Programa de Pós-graduação em Biologia Oral da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, USP.

Área de concentração: Biologia Oral.

Orientador: Branco, Luiz Guilherme.

Versão Original

1. Dor Orofacial. 2. Inflamação.
3. Disfunções Temporomandibulares.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Wanderson da Silva dos Santos

Título: Efeito anti-hipernociceptivo orofacial do citral em modelos inflamatórios agudos e persistentes em ratos

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Oral.

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof(a). Dr(a): _____

Instituição: FORP - USP

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a): _____

Instituição: FORP - USP

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a): _____

Instituição: FORP - USP

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a): _____

Instituição: FORP - USP

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Dedicat3ria

Dedico este trabalho a Deus por sua infinita misericórdia, bondade e providência. Nossa Senhora da Graça por sua intercessão e cuidado durante esses anos de mestrado.

A comunidade católica Shalom, por ser família e por todas as orações dos meus irmãos.

Aos meus pais, Reginaldo Noberto dos Santos e Josefa da Silva Santos, que são apoio e amor constantes.

Dedico também aos meus irmãos Wellington e Williane, que estiveram comigo, ajudando em tudo que precisei.

Ao Prof. Dr. Luiz Guilherme de Siqueira Branco por todo conhecimento, orientação e confiança em meu trabalho.

Agradecimientos

Agradeço,

Ao Prof. Dr. Luiz Guilherme de Siqueira Branco por todo conhecimento, orientação e confiança em meu trabalho.

À Dra. Bruna Maitan Santos e ao Dr. Luis Henrique Angenendt, pela ajuda durante a pesquisa, pelos ensinamentos e amizade.

Às minhas amigas de laboratório Dra. Patrícia Passaglia, Isis Trajano e Katiuscia Martins de Araújo, que tornaram a rotina mais acessível, é um imenso prazer compartilhar a pós-graduação com vocês..

Aos técnicos e auxiliares de laboratório Júnia Ramos, Mauro Ferreira Silva e Nadir Martins Fernandes.

À secretária Imaculada Jainara Miguel pelo auxílio com todas as dúvidas e demais assuntos sobre o funcionamento dos procedimentos administrativos da pós-graduação.

Agradeço a todos os professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Biologia Oral.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro através do processo nº 88887.798380/2022-00.

Aos que não foram mencionados, mas estão no meu coração. Obrigado!

Epígrafe

*“Deus não poderia inspirar em mim
desejos irrealizáveis.”*

Santa Terezinha do Menino Jesus

Resumo

SANTOS, W. S. **Efeito anti-hipernociceptivo orofacial do citral em modelos inflamatórios agudos e persistentes em ratos.** 2023. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

Resumo

A dor orofacial tem efeitos psicológicos e fisiopatológicos importantes. Além disso, tanto o diagnóstico quanto o tratamento da dor orofacial são desafiadores devido ao complexo arranjo do sistema trigêmeo, exigindo uma constante necessidade de identificação de novas drogas analgésicas mais eficientes. O Citral (3,7-dimetil-2,6-octadienal) é o principal componente do *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf, uma erva com propriedades analgésicas, relatadas em relação ao sistema somatossensitivo periférico. Embora o citral seja considerado um potente analgésico, seus supostos efeitos sobre a dor orofacial ainda são desconhecidos. Portanto, testamos a hipótese de que o citral modula a dor orofacial usando dois modelos experimentais: hiperalgesia induzida por formalina na área das vibrissas e durante hipernocicepção temporomandibular persistente usando o teste Adjuvante Completo de Freund - CFA. Para o teste da formalina, citral (100 e 300 mg/kg, via oral) ou seu veículo (Tween 80, 1%) foram administrados 1 hora antes da injeção de formalina (administrado 50 ul) por via subcutânea (sc) na área das vibrissas. Para o modelo de CFA, analisamos tanto o efeito profilático (100 mg/kg de citral por gavagem oral, 1 hora antes da injeção de CFA), como o efeito terapêutico crônico (100 mg/kg de citral por gavagem oral 1 hora após a injeção de CFA e diariamente após a injeção de CFA) do citral ou seu veículo em animais tratados com CFA por 8 dias. O Citral causou uma diminuição na inflamação local (medida por meio da dosagem de citocinas IL-6 e IL-10 e do IFN- γ) induzida por formalina e no tempo gasto realizando comportamento nociceptivo, de forma dose-dependente. Da mesma forma, o tratamento profilático e terapêutico com citral diminuiu a hipernocicepção mecânica persistente, induzida por CFA na área temporomandibular. Nossos dados indicam que o citral desempenha um poderoso papel antinociceptivo orofacial.

Palavras-chave: Dor orofacial, disfunções temporomandibulares, inflamação, sistema trigeminal, formalina, adjuvante completo de Freund, proteômica

Abstract

SANTOS, W. S. **Orofacial anti-hypernociceptive effect of citral in acute and persistent inflammatory models in rats.** 2023. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

Abstract

Orofacial pain has significant psychological and physiological effects. Moreover, both diagnosis and treatment of orofacial pain are challenging due to the complex arrangement of the trigeminal system, demanding a constant need to identify new efficient analgesic drugs. Citral (3,7-dimethyl-2,6-octadienal) is the main component of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf, an herb with analgesic properties. Although citral has been considered a potent analgesic, its putative effects on orofacial pain are still unknown. Therefore, we tested the hypothesis that citral modulates orofacial pain using two experimental models: formalin-induced hyperalgesia in the vibrissae area and during persistent temporomandibular hypernociception using Complete Freund's Adjuvant - CFA test. For the formalin test, citral (100 and 300 mg/kg, oral gavage) or its vehicle (Tween 80, 1%) were given 1 hour before the formalin (administered 50 ul) injection subcutaneously (sc) into the vibrissae area. For the CFA model, we analyzed the prophylactic (100 mg/kg of citral by oral gavage, 1 hour before CFA injection) and the chronic therapeutic (100 mg/kg of citral by oral gavage 1-hour post-CFA injection and daily post-CFA injection) effect of citral or its vehicle in animals treated with CFA for 8 days. Citral caused a decrease in formalin-induced local inflammation (measured by measuring IL-6 and IL-10 cytokines and IFN- γ) and the time spent performing nociceptive behavior in a dose-dependent fashion. Similarly, prophylactic and therapeutic citral treatment decreased the CFA-induced persistent mechanical hypernociception in the temporomandibular area. Our data indicate that citral plays a powerful orofacial antinociceptive role.

Keywords: Orofacial pain, temporomandibular disorders, inflammation, trigeminal system, formalin, complete Freund's Adjuvant.

Sumário

SUMÁRIO

1.....	INTRODUÇÃO.....	22
2.....	PROPOSIÇÃO.....	28
3.....	OBJETIVO.....	30
4.....	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
5.....	MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
5.1.....	Animais.....	31
5.2.....	Drogas.....	31
5.3.....	Grupos experimentais	32
5.5.....	Modelo de hiperalgesia induzida por formalina (teste de formalina).....	32
5.6.....	Avaliação de citocinas.....	32
5.6.....	Hipernocicepção orofacial persistentes indizadas por CFA.....	32
5.6.....	Avaliação de mudanças anormais de temperatura.....	33
5.6.....	Estatística.....	33
5.6.....	RESULTADOS.....	36
5.5.....	DISCUSSÃO.....	43
5.6.....	CONCLUSÃO.....	47
5.6.....	BIBLIOGRAFIA.....	49
5.6.....	ANEXOS.....	59

Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Linha do tempo ilustrativa do potencial efeito antinociceptivo do citral após injeção pós-formalina 2,5% no lábio superior (unilateral).....	36
Figura 2A.	Média da soma do tempo (em segundos) gasto realizando comportamentos nociceptivos de cada grupo na fase 2 do teste da formalina.....	38
Figura 2B.	Concentração de TNF- α tecidual	39
Figura 2C.	Concentração de IL-1 β tecidual	39
Figura 2D.	Concentração de IL- 6 tecidual	39
Figura 2E.	Concentração de IFN- γ tecidual	39
Figura 2F.	Concentração de IL-10 tecidua	39
Figura 3A.	Linha do tempo ilustrativa do experimento para avaliar o efeito profilático e terapêutico do citral na alodinia orofacial induzida por CFA.	41
Figura 3B.	Imagens termográficas mostram especificamente a área de vibrissas analisada dos ratos.....	41
Figura 3C.	Limiar mecânico orofacial (em gramas) após CFA com tratamento com citral ou administração de veículo dividido em profilático ou terapêutico.	42
Figura 3D.	Temperatura ($^{\circ}$ C) da região das vibrissas após CFA e tratamento profilático ou terapêutico com citral.	42

Abreviações

ATM - Articulação temporomandibular

CFA – Adjuvante Completo de Freund

EUA - Estados Unidos da América

g - Gramas

Gvg - Gavagem

i.a – Intra articular

IFN – Fator de Necrose Tumoral

IL - Interleucina

Kg - Quilograma

Mg - Miligramas

Min - Minutos

NIH – Instituto Nacional de Dor

s - Segundos

SBD OF – Sociedade Brasileira de Disfunção Temporomandibular e Dor orofacial

Sc - Via subcutânea

SNC - Sistema Nervoso Central

SPF – Livre de Patógenos Específicos

TNF – fator de Necrose Tumoral

VF – Von Frey

µl – Microlitro

Introdução

1 Introdução

A dor é caracterizada por uma sensação desagradável e desconfortável que pode ocorrer em todo o corpo. É uma resposta sistêmica a estímulos dolorosos, que podem ser causados por inflamação ou lesão (LOESER; MELZACK, 1999), que envolve a produção de estímulos nocivos, sendo seu processamento cognitivo emocional realizado pelo Sistema Nervoso Central (SNC) (JULIUS; BASBAUM, 2001). A dor pode ser classificada em diferentes tipos, como aguda, que é súbita e intensa; ou crônica, que é persistente (COHEN; VASE; HOOTEN, 2021). Além disso, pode ser categorizada como nociceptiva (danos teciduais), inflamatória e neuropática (danos nos nervos) (LEE; LEE; OH, 2005).

A dor aguda é uma resposta fisiológica do corpo e sua sensação é desencadeada por receptores nervosos chamados nociceptores, que são ativados quando ocorre lesão tecidual, inflamação ou infecção. Quando os nociceptores são ativados, eles enviam sinais elétricos ao encéfalo por meio das fibras nervosas aferentes (BELL, 2018). O cérebro interpreta esses sinais como uma sensação intensa ou latejante. A dor aguda protege o organismo potencialmente nocivo por meio da ativação fásica de nociceptores por estímulos nocivos, evocando respostas protetoras, como uma reação de fuga e retraimento motor, de modo que a exposição ao estímulo nocivo cessa (KUNER; KUNER, 2021; MEINTJES, 2012).

A dor crônica, por sua vez, é um problema de saúde pública mundial (BREIVIK et al., 2006), e tem condições subjacentes, incluindo doenças e danos nos nervos por trauma, ela afeta qualquer parte do corpo, seja leve, moderada ou grave (KUNER; KUNER, 2021). O Estudo da Carga Global de Doenças em 2016, citou que a dor crônica é uma das principais causas de incapacidade em todo o mundo e pode impactar significativamente a qualidade de vida das pessoas (VOS et al., 2017). A dor crônica pode afetar qualquer pessoa, independentemente da idade, sexo ou raça, mas certos fatores de risco podem aumentar as chances de desenvolvê-la, como a obesidade e o envelhecimento (PAUL-SAVOIE et al., 2018; MCCARTHY et al., 2009; FAYAZ et al., 2016). As opções de tratamento podem incluir medicamentos, fisioterapia e mudanças no estilo de vida (HYLANDS-WHITE; DUARTE; RAPHAEL, 2017).

Adicionalmente, o aumento da resposta à dor neuropática de um estímulo doloroso e a sensação dolorosa de um estímulo não doloroso é chamado de

hiperalgesia e alodinia, respectivamente (JENSEN; FINNERUP, 2014; LOESER; TREEDE, 2008; JIANG et al., 2021). O primeiro está associado a uma resposta de dor aumentada produzida por um estímulo que normalmente causaria dor. Já a alodinia é caracterizada por um estímulo que normalmente não causaria dor. Tanto a hiperalgesia como a alodinia são temas de grande interesse na dor e na neurociência (JENSEN; FINNERUP, 2014; LEE et al., 2011; ROECKEL et al., 2016). Esses estudos exploram as causas subjacentes desses distúrbios e buscam novas formas de tratamento (JENSEN; FINNERUP, 2014; VRANKEN et al., 2011). Por exemplo, um estudo publicado em 2008 descobriu que entre 1.600 pacientes com neuropatia dolorosa, 18% relataram que o toque leve era doloroso e 14% relataram que o frio ou o calor causavam dor (DRAY, 2008).

Uma vertente de estudo da dor que vem ganhando destaque cada vez maior é a dor orofacial. O conceito de dor orofacial dado pela Sociedade Brasileira de Disfunção Temporomandibular e Dor Orofacial (SBDOF) é “toda a dor associada a tecidos moles e mineralizados (pele, vasos sanguíneos, ossos, dentes, glândulas ou músculos) da cavidade oral e da face”. Tanto a incidência quanto a prevalência de dor orofacial são consideradas muito altas. Estudos relatam que mais de 20% da população mundial tem dor orofacial (ANANTHAN; BENOLIEL, 2020) e pacientes com dor aguda ou crônica lidam com grande estresse físico e emocional, pois os desafios significativos na obtenção de cuidados adequados ainda são limitados, resultando em custos sociais consideráveis (TECCO; BALLANTI; BALDINI, 2018). Sua etiologia é classificada como de origem odontogênica ou não odontogênica. A odontogênica é mais fácil de diagnosticar e tratar, pois é mais comumente causada por doenças dentárias (GREGORY et al., 2013). No entanto, o manejo mais desafiador é a dor de origem não odontogênica, que são doenças musculoesqueléticas ou neuropatológicas (ŠKLEBAR et al., 2015).

A fisiologia da dor orofacial é complexa e envolve vários mecanismos, incluindo sensibilização dos nervos periféricos, funções cerebrais superiores e ativação de neurônios na medula espinhal e no sistema nervoso central (ROTPENPIAN; YAKKAPHAN, 2021). A via da dor trigeminal é responsável por transmitir as informações de dor, tato e temperatura da região da face para o cérebro (Patel et al., 2023). Essa via começa nos receptores sensoriais da face, que são principalmente terminações nervosas acessíveis localizadas na pele, músculos, ossos e outros tecidos orofaciais (LAVIGNE; SESSLE, 2016). Esses receptores sensoriais enviam sinais através de fibras nervosas periféricas dos três ramos do nervo trigêmeo: oftálmico, maxilar e mandibular. Esses ramos se fundem em um

tronco nervoso que entra no tronco encefálico na ponte, onde a informação é processada (ROTPENPIAN; YAKKAPHAN, 2021; SESSLE, 2006).

O tronco encefálico contém os núcleos do trigêmeo responsáveis pelo processamento de informações sensoriais da face. Esses núcleos são organizados em sensoriais (núcleo espinhal, núcleo principal, núcleo mesencefálico) e núcleo motor (TERRIER; HADJIKHANI; DESTRIEUX, 2022). Fibras nervosas do núcleo central cruzam a linha média e sobem pela via trigeminal até o tálamo, onde as informações são processadas e transmitidas ao córtex somatossensorial e, são percebidas as sensações (LAVIGNE; SESSLE, 2016).

Dentre as desordens que podem levar à dor orofacial, destacam-se as disfunções temporomandibulares (DTMs), que apresentam sintomas como estalidos ao abrir ou fechar a boca, dificuldade para mastigar e limitação dos movimentos mandibulares (BEAUMONT et al., 2020). As causas da DTM são pouco conhecidas, mas acredita-se que estejam relacionadas a trauma na mandíbula, procedimentos odontológicos de alto risco, estresse ou lesão na articulação temporomandibular (BARON et al., 2009; CHANG et al., 2018; GAUER; SEMIDEY, 2015). Estudos indicam que há diferenças na modulação da dor da DTM, sendo que as mulheres são mais propensas a experimentar DTM do que os homens, em virtude das diferenças hormonais, pois o estrogênio pode afetar a percepção e a sensibilidade da dor (MILAM; ZARDENETA; SCHMITZ, 1998; BHALANG et al., 2005; DE LEEUW et al., 2006).

Para a indução da dor orofacial inflamatória aguda em ratos, estudos recentes utilizam a formalina 2,5%, administrada à região da vibrissas (MAEGAWA et al., 2019) e para dor orofacial persistente a administração bilateralmente nas articulações temporomandibulares com o CFA (100 mg/kg) (MA et al., 2020; KRAMER; BELLINGER, 2013). Posteriormente, avalia-se o comportamento dos animais frente a dor inflamatória (DO NASCIMENTO; LEITE-PANISSI, 2014). A formalina promove inflamação local com recrutamento das células imunes e conseqüentemente, aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias (CHICHORRO; LORENZETTI; ZAMPRONIO, 2004), resultando em elevação da temperatura no tecido afetado, ou seja, nas vibrissas (que podem ser avaliadas por termografia). Por sua vez, o Teste de Von Frey, permite a avaliação da sensibilidade tecidual ao estímulo mecânico na região temporomandibular (ALVES et al., 2017).

Estudos sugerem que as citocinas podem desempenhar um papel essencial na dor orofacial, incluindo o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6) (CHICHORRO; LORENZETTI; ZAMPRONIO, 2004; SEADI

PEREIRA et al., 2009). Essas citocinas são liberadas por células do sistema imunológico, como os macrófagos e contribuem para a sensibilização dos neurônios nociceptivos, que aumenta a percepção da dor (AYOUB; BERBÉRI; FAYYAD-KAZAN, 2020; NICOL; LOPSHIRE; PAFFORD, 1997). Além disso, foi observado em animais com inflamação orofacial, níveis elevados de citocinas, como o TNF- α e a IL-1 β , no gânglio do trigêmeo (BASU et al., 2019). Da mesma forma, em animais com distúrbios da articulação temporomandibular (ATM), tanto em modelo agudo quanto em persistente, observou-se aumento das citocinas no tecido articular (GARATTINI et al., 2019). Esses achados sugerem que as citocinas podem contribuir para o desenvolvimento e manutenção da dor orofacial, promovendo a inflamação. O controle da liberação das citocinas ou da ativação dos seus receptores pode, portanto, ser uma estratégia terapêutica potencial para o controle da dor.

Apesar de vários relatórios recentes sobre pesquisas fundamentais sobre o sistema nociceptivo trigeminal (HARGREAVES, 2011; HARRIOTT; GOLD, 2008; MARTINEZ-GARCIA; MIGUELANEZ-MEDRAN; GOICOECHEA, 2019; OKAMOTO et al., 2010), ainda estamos longe de um cenário preciso, em relação às propriedades das aferências trigeminais que inervam tecidos-alvo distintos (HERRERO BABILONI et al., 2022). Por outro lado, parece que o tecido-alvo não é simplesmente um local passivo onde estão as terminações das fibras aferentes. Em vez disso, esses tecidos parecem interagir efetivamente com os terminais dos neurônios de maneira complexa por meio de inervação múltipla e específica do tecido, o que pode explicar as diferenças na capacidade de resposta das fibras aferentes do trigêmeo em relação aos neurônios aferentes espinhais, sob condições basais e após lesão tecidual (OKADA et al., 2019).

Diferentes substâncias analgésicas e anti-inflamatórias estão sendo estudadas para a atenuação dos sintomas da dor orofacial, mas não se conhecia os potenciais efeitos do Citral (3,7- dimetil-2,6-octadienal), mistura monoterpênoides (neral e geranial), que é obtida a partir de óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* e *Zingiber officinale*, conhecidas popularmente como capim-limão e gengibre, respectivamente (MANGPRAYOOL; KUPITTAYANANT; CHUDAPONGSE, 2013). Esta substância tem propriedades gastroprotetoras (NISHIJIMA et al., 2014), antiprotozoários (SANTIN et al., 2009), antibacterianas (TOFIÑO-RIVERA et al., 2016), antiinflamatórias (MOTA et al., 2020; (SONG et al., 2016), antipirético (EMÍLIO-SILVA et al., 2017), ansiolítico (COSTA et al., 2011) e analgésico sistêmico (NISHIJIMA et al., 2014).

Apesar dos mecanismos de ação do citral na dor orofacial serem desconhecidos, estudos anteriores indicam uma ação anti-inflamatória desse agente sobre a redução da liberação de mediadores inflamatórios endógenos, como glutamato, prostanóides (PGE_2), óxido nítrico e citocinas (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) que induzem a dor (EMÍLIO-SILVA et al., 2017; NISHIJIMA et al., 2014). Sendo assim, nesta dissertação testou-se a hipótese de que o citral possui potencial analgésico não somente na dor sistêmica, mas também na dor orofacial.

Proposição

2 Proposição

Considerando a importância crucial do tratamento da dor orofacial, o objetivo foi avaliar os possíveis efeitos analgésicos do citral (doses de 100 e 300 mg/kg) e os mecanismos associados a esses efeitos usando dois modelos experimentais bem aceitos: teste da formalina, que é considerado uma forma consistente de produzir e quantificar a hipernocicepção na região trigeminal do rato (RABOISSON; DALLEL, 2004) e o modelo de dor inflamatória crônica induzida por injeção de CFA nas articulações temporomandibulares (WU et al., 2010).

Objetivos

3 OBJETIVO GERAL

Portanto, o presente projeto teve como objetivo avaliar os possíveis efeitos analgésicos do citral e os mecanismos associados a esses efeitos durante a resposta nociceptiva do animal a uma situação de dor contínua e persistente.

4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos foram obtidos por meio dos seguintes parâmetros:

- Efeito do Citral nas concentrações de 100 e 300 mg, administrado por gavagem na resposta de hiperalgesia orofacial;
- Os de níveis das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6, IFN- γ e IL-10 na região de vibrissas;
- A ação do Citral no tratamento profilático e terapêutico na alodinia orofacial induzido por CFA;
- A temperatura ($^{\circ}\text{C}$) da região das vibrissas, após CFA e em tratamento profilático ou terapêutico com o Citral.

Materiais e

Métodos

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Animais

Ratos machos livres de patógenos (SPF) Wistar Hannover, pesando entre 220 e 230 g no início dos experimentos, foram alojados em gaiolas coletivas (3 animais por gaiola) com temperatura ambiente controlada variando de 24-25 °C com 12 horas de ciclo claro-escuro (começando às 7h) e com comida e água ad libitum. Todos os estudos foram realizados no período da manhã para diminuir as variabilidades (8-12h). Os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética Animal, da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (nº 2019.1.36.58.7), da Universidade de São Paulo. Os tratamentos estão em acordo com as diretrizes de pesquisa animal do Instituto Nacional de Saúde (NIH, publicação #80-23). O experimentador principal verificou diariamente o estado de saúde individual do animal. Os animais foram manuseados regularmente antes de iniciar os experimentos e durante os mesmos. A eutanásia foi realizada por decapitação para coleta de amostra da área das vibrissas da pele.

5.2 Drogas

Citral (Sigma, St. Louis, MO, EUA) foi diluído em solução de Tween 80 a 1% (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), formalina 2,5% (utilizando Formaldeído 37% - Chemco Ind. e Com. Campinas, Brasil) diluída em soro fisiológico livre de patógenos e Adjuvante Completo de Freund (CFA, indutor de inflamação temporomandibular - Sigma, St. Louis, MO, EUA) foram utilizados. Conforme descrito anteriormente, em estudo prévio deste laboratório (Emílio-Silva et al., 2017), o Tween 80 a 1% não tem efeito quando administrado sozinho.

5.3 Grupos experimentais

Para analisar o efeito antinociceptivo do citral na dor orofacial, esta droga foi administrada por gavagem oral (gvg) 1 hora antes da injeção de CFA (dose: 100 mg/kg) ou formalina (dose: 100 e 300 mg/kg gvg) para analisar seu efeito profilático. Também procuramos avaliar seu efeito terapêutico na nocicepção orofacial persistente por meio da administração de citral 1 hora após a injeção de CFA, seguida de injeções diárias de citral até o último dia do experimento (dose: 100 mg/kg gvg). Antes de iniciar as injeções, os animais foram habituados à gavagem para diminuir potenciais respostas estressantes devido à novidade do procedimento e à expansão volumétrica gástrica involuntária induzida pela administração das soluções (citral ou seu veículo). Foi realizado um treinamento de inserção de agulha

por gavagem por 2 dias, seguido por um treinamento de 2 dias com administração de solução salina por gavagem oral no mesmo volume usado para administrar citral.

5.4 Modelo de hiperalgesia induzida por formalina (teste de formalina)

Primeiramente, os ratos foram habituados à caixa de teste (caixa de acrílico medindo 46 cm (comprimento) x 46 cm (largura) x 46 cm (altura) e à sala experimental silenciosa por 1 hora, 1 dia antes do teste de formalina. Além disso, os animais foram autorizados a explorar o ambiente 20 minutos antes da injeção de formalina. A solução de formalina foi injetada rapidamente na área das vibrissas (unilateral - lado direito) em 50 µl. Posteriormente, os animais retornaram à caixa de teste para avaliar o tempo gasto realizando comportamento por 45 min, contagem de blocos de 3 min. Já está bem descrito em estudos de dor orofacial que a injeção de formalina na área orofacial produz uma reação bifásica de fricção orofacial expressa por uma fase inicial abrupta de cerca de 2-5 min, seguida por um período quiescente, e depois uma segunda fase mais duradoura (Donatti et al., 2014). O efeito antinociceptivo do citral foi testado em duas doses diferentes usadas na literatura (100 e 300 mg/kg gvg). A hipernocicepção aguda foi avaliada usando a quantidade de tempo gasto realizando comportamento nociceptivo medido em segundos (s) por animal em cada condição.

5.5 Avaliação de citocinas

Conforme descrito em estudo prévio do laboratório (Amorim et al., 2020), os níveis de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IFN- γ e IL-10 foram determinados usando kits de ensaio multiplex de acordo com instruções padrão (LXSARM—05, R&D System, EUA) com tecnologia Luminex Magpix (EUA). Amostras da área das vibrissas ipsilaterais foram coletadas e congeladas a -70°C até a análise. Os resultados são expressos em pg/mg de tecido.

5.6 Hipernocicepção orofacial persistentes induzidas por CFA

Os ratos foram rapidamente anestesiados com inalação de isoflurano (Cristalia, Brasil) e CFA foi injetado bilateralmente nas articulações temporomandibulares. A articulação temporomandibular foi demarcada pela palpação simples da área do arco zigomático próximo ao côndilo e, usando a avaliação dessas estruturas, a agulha foi inserida imediatamente abaixo da borda pósterio-inferior do arco zigomático e avançada anteriormente para contatar a borda do côndilo posterolateral (Zhou e outros, 1999). O CFA é um estímulo químico que

induz inflamação persistente causando hipernocicepção orofacial. Aqui, usamos o método de Von Frey para avaliar a alodinia induzida por CFA. Resumidamente, forças progressivas do filamento de um anestesiómetro eletrônico Von Frey (Insight Instruments, Brasil) foram aplicadas na região temporomandibular até o reflexo de retirada da cabeça. A força aplicada pode induzir um reflexo de retirada da cabeça (medido em gramas) (Santos et al., 2018). Esta medida foi utilizada para avaliar a hipernocicepção ao longo dos dias experimentais. Os animais foram colocados em câmaras de teste individuais um dia antes da injeção de CFA para adaptação. Nos dias de medições de Von Frey, os animais foram colocados nas mesmas câmaras de teste pelo menos 30 minutos antes da análise de Von Frey.

5.7 Avaliação de mudanças anormais de temperatura

Este estudo foi o primeiro a avaliar as possíveis mudanças anormais de temperatura induzidas por CFA intra-articularmente (ia) em ratos. Uma câmera de sensibilidade termográfica (FLIR 8, FLIR Systems Inc., EUA) foi usada para medir a temperatura média (em °C) na área das vibrissas de ratos durante o teste de formalina para avaliar possíveis mudanças da temperatura local neste modelo. A foto termográfica foi tirada a cerca de 30 cm do rato em ambos os lados da face. A área das vibrissas foi demarcada na foto termográfica por um círculo que toca duas linhas imagináveis traçadas entre o nariz do rato e seu olho e a pequena linha termográfica observada entre seus lábios (ver Fig. 3B para maiores detalhes). A área de contorno entre a área das vibrissas e o ambiente foi destacada em todas as fotos. Medimos indiretamente a temperatura central do corpo por meio da temperatura mais alta medida em cada olho do animal, conforme relatado em estudo prévio (Vogel et al., 2016).

5.8 Estatísticas

O experimentador era cego para as condições do grupo. ANOVA two-way ordinária seguida do pós-teste de comparações múltiplas de Dunnett foi utilizada para avaliar o efeito geral das duas doses de citral no tempo gasto realizando o comportamento nociceptivo induzido pela formalina em relação ao grupo controle que recebeu seu veículo (Tween 80 1%) (Fig. 1). Para analisar a diferença na média de tempo gasto esfregando o rosto na fase 2 do teste de formalina de animais tratados com citral em comparação com seu controle, realizamos análises ANOVA de uma via comum seguidas de análise LSD de Fischer não corrigida (Fig. 2A). Realizamos a mesma análise para avaliação das citocinas (Fig. 2B-F). ANOVA two-

way seguida de múltiplas comparações pós-teste de Dunnett foi usada para avaliar o efeito profilático e terapêutico do citral em comparação com seus controles em hipernocicepção persistente e hiperemia induzida por CFA (Fig. 3C e D). Os dados são apresentados como média \pm SEM e considerados significativos quando $P < 0,05$.

Resultados

6 Resultados

6.1 Pré-tratamento com citral atenua a hiperalgesia inflamatória orofacial de forma dose-dependente

No geral, o pré-tratamento com citral a 100 e 300 mg/kg administrado por gavagem causou uma diminuição significativa ($p < 0,05$) no tempo gasto realizando comportamento nociceptivo em comparação ao grupo controle no teste da formalina (Fig. 1). No entanto, esse efeito não é observado na fase 1 do teste da formalina quando avaliado separadamente (grupo tratado com Tween 80: $9,78s \pm 1,31s$; grupo tratado com citral 100 mg/kg: $12,94s \pm 2,42s$; citral 300 mg/kg - grupo tratado: $6,39s \pm 2,36s$). O pré-tratamento com citral na dose de 300 mg/kg promoveu uma diminuição efetiva no comportamento nociceptivo de fricção facial (Fig. 2A) induzido pela formalina, na segunda fase do teste da formalina ($22,28s \pm 5,79s$), em comparação com o grupo controle tratado com Tween 80 ($62,77s \pm 6,88s$) e grupo tratado com citral em dose menor (100 mg/kg; fase 2: $46,12s \pm 3,86s$). O grupo tratado com menor dose de citral (100 mg/kg gvg) apresentou diminuição o tempo gasto realizando o comportamento de dor orofacial em comparação com o grupo controle tratado com Tween 80 na segunda fase, notadamente menos eficaz em diminuir a hipernocicepção do que usando uma dose maior de o mesmo composto (300 mg/kg gvg).

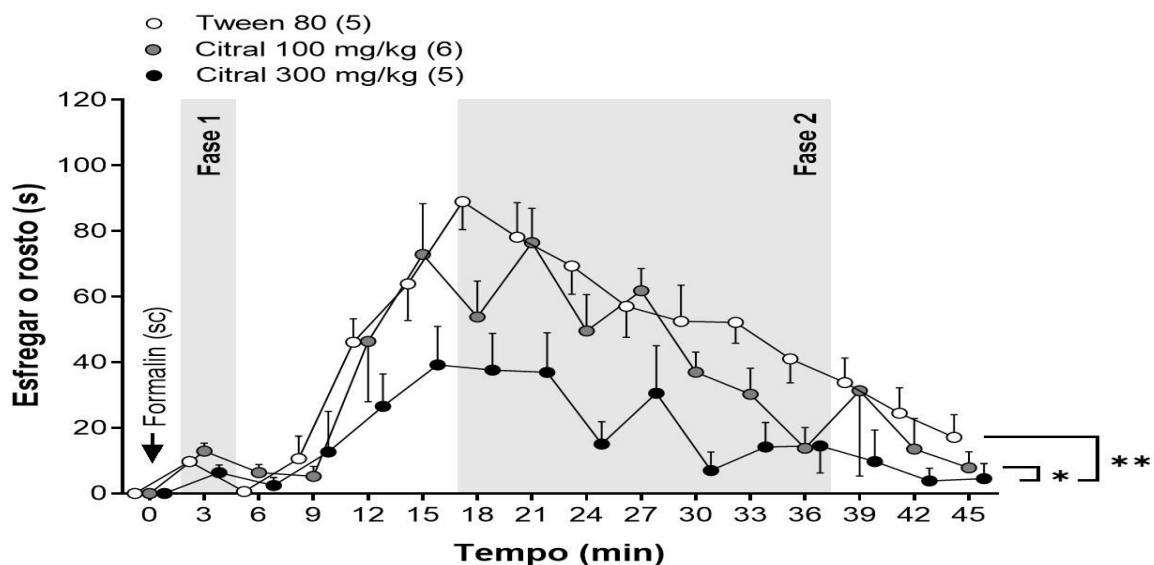


Figura 1 – Linha do tempo ilustrativa do potencial efeito antinociceptivo do citral após injeção pós-formalina 2,5% no lábio superior (unilateral). A injeção de formalina (tempo 0) é indicada por uma seta. A Fase 1 (0–3 min pós-injeção de formalina) e a Fase 2 (18–36 min pós-injeção de formalina) de um modelo de

nocicepção orofacial induzida por formalina são delimitadas nos painéis cinza. Os testes foram realizados em grupos tratados com citral controle veículo (Tween 80 1%), citral em menor concentração (100 mg/kg) e citral em maior concentração (300 mg/kg). O tempo gasto produzindo comportamentos nociceptivos após a injeção de formalina foi calculado pela soma do tempo (em segundos) de cada animal esfregando a região orofacial em blocos não intercalados de 3 minutos. Os dados são apresentados como médias \pm SEM. N (5–6).

6.2 Tratamento com citral modula os níveis de citocinas na região orofacial de forma dose-dependente

Para entender o possível efeito anti-inflamatório do citral na liberação de citocinas periféricas induzida por formalina, medimos algumas citocinas pró e anti-inflamatórias importantes relacionadas à resposta à dor localmente. O tratamento com citral não provocou alterações nos níveis de TNF- α e IL-1 β na área lesada em comparação com os animais tratados com seu controle (Fig. 2B e C). No entanto, o tratamento com citral em menor dose (100 mg/kg gvg) diminuiu os níveis de duas citocinas consideradas pró-inflamatórias, especificamente IL 6 e IFN- γ ($9,96 \pm 1,46$ pg/mg; $38,81 \pm 5,12$ pg/mg, respectivamente) em comparação com o grupo controle tratado com Tween 80 ($24,78 \pm 5,02$ pg/mg; $80,77 \pm 13,39$ pg/mg, respectivamente). Apesar do efeito anti-inflamatório do citral observado na menor dose indicada pela diminuição de ambas as citocinas, o tratamento com citral na dose mais elevada (300 mg/kg) não causou redução dos níveis de IL-6 e IFN- γ ($24,26 \pm 5,72$ pg/mg; $97,26 \pm 22,69$ pg/mg, respectivamente) em comparação com o grupo controle. Curiosamente, o citral em dose maior (300 mg/kg) aumentou os níveis da citocina anti-inflamatória IL-10 ($2,37 \pm 0,44$ pg/mg), mas sem efeito em dose menor ($0,65 \pm 0,09$ pg/mg) em comparação com o grupo controle ($1,08 \pm 0,16$ pg/mg), indicando que seu mecanismo de ação anti-inflamatório pode ser dose-dependente.

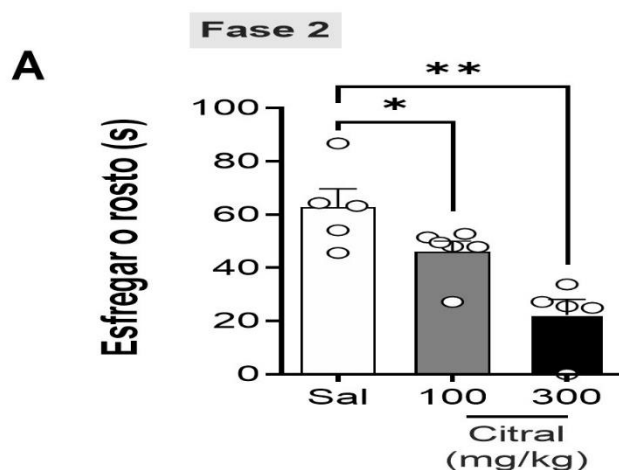


Figura 2A – Média da soma do tempo (em segundos) gasto realizando comportamentos nociceptivos de cada grupo na fase 2 do teste da formalina.

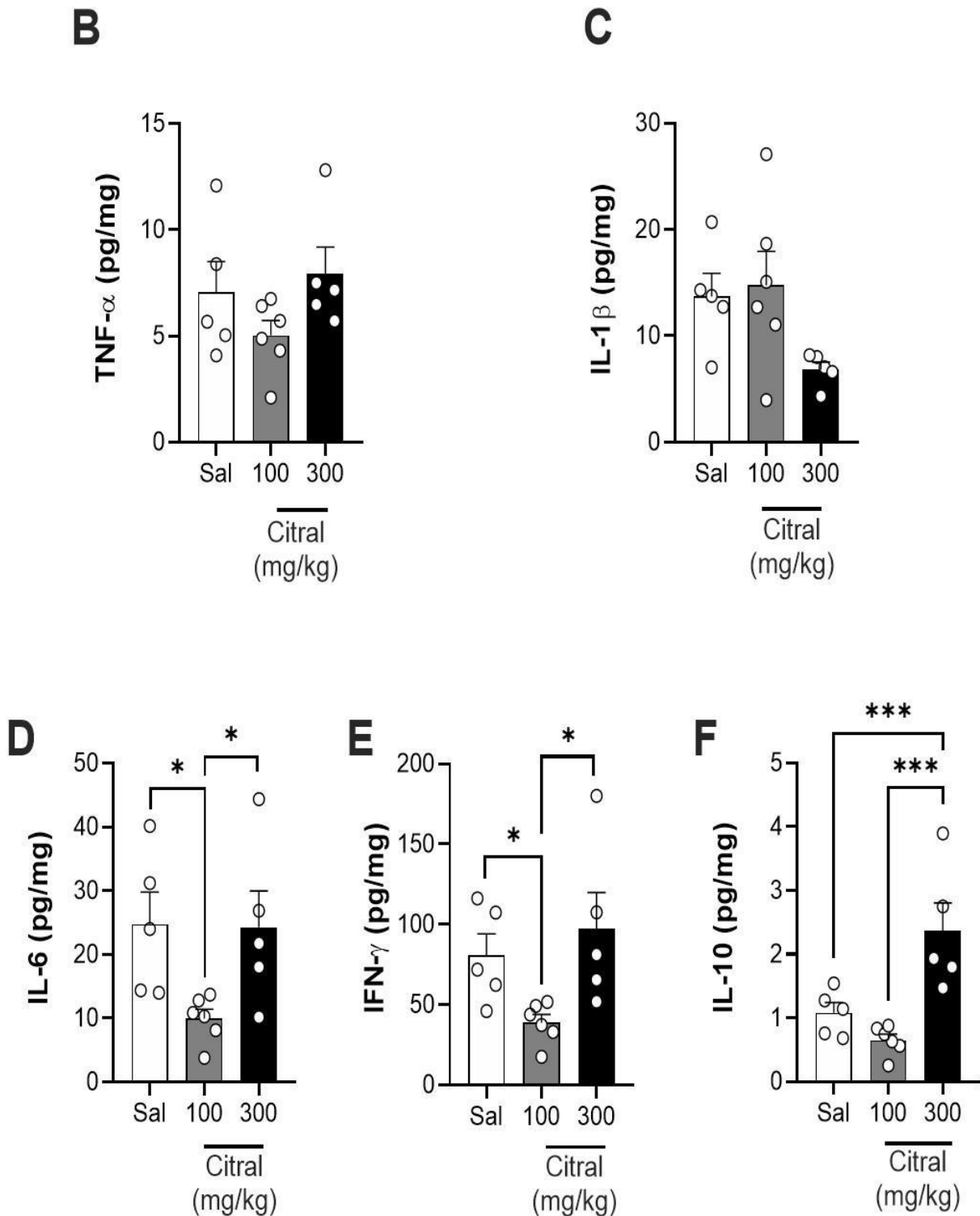


Figura 2B – TNF- α tecidual, (C) IL-1 β , (D) IL-6, (E) concentração de IFN- γ e (F) IL-10 (pg/mg) 45 minutos após a injeção de formalina em ratos tratados com citral (100 ou 300 mg/kg) ou seu veículo (Tween 80). Os dados são apresentados como média \pm SEM. N (5-6). * $P \leq 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

6.3 Citral atenua a alodinia inflamatória orofacial

O tratamento profilático com citral produziu um aumento significativo no limiar mecânico de retirada da cabeça em todos os dias analisados após a inflamação induzida por CFA (Fig. 1B, canto inferior esquerdo) em comparação com o grupo CFA/Tween 80 sob processo inflamatório (dia 1: $45,52 \pm 3,94$ g; dia 3: $46,37 \pm 4,69$ g; dia 5: $47,76 \pm 3,27$; dia 8: $39,78 \pm 3,55$ g vs. dia 1: $25,38 \pm 2,45$ g; dia 3: $29,40 \pm 3,89$ g; dia 5: $29,25 \pm 2,99$ g ; dia 8: $22,63 \pm 3,76$ g, respectivamente). Da mesma forma, o citral administrado terapêuticamente causou redução do limiar mecânico de retirada da cabeça após cada dia de inflamação temporomandibular (dia 1: $44,44 \pm 4,45$ g; dia 3: $51,97 \pm 6,04$ g; dia 5: $46,17 \pm 3,73$ g; dia 8: $40,17 \pm 4,01$ g) em comparação com tratamento de controle de veículo (dia 1: $25,38 \pm 2,45$ g; dia 3: $29,40 \pm 3,89$ g; dia 5: $29,25 \pm 2,99$ g; dia 8: $22,63 \pm 3,76$ g). Apesar do CFA ter sido administrado na ATM, este tratamento causou indiretamente um aumento na temperatura da área das vibrissas, indicando que o processo inflamatório articular causou alterações em toda região orofacial, em comparação com os animais tratados com solução salina (grupo salina: $32,71 \pm 0,20^\circ\text{C}$ vs. grupo CFA: $33,72 \pm 0,39^\circ\text{C}$). Ambos os tratamentos com citral diminuíram a resposta hiperêmica induzida por CFA localmente no primeiro dia de tratamento (citral profilático: $32,00 \pm 0,16^\circ\text{C}$; citral terapêutico: $32,46 \pm 0,39^\circ\text{C}$; Tween 80: $33,72 \pm 0,39^\circ\text{C}$). Em conjunto, os dados indicam não apenas o efeito protetor e terapêutico do citral quando administrado nos estágios iniciais da resposta hipernociceptiva induzida pelo CFA, mas também seu efeito anti-hiperêmico diminuindo a hipernocicepção persistente no modelo CFA.

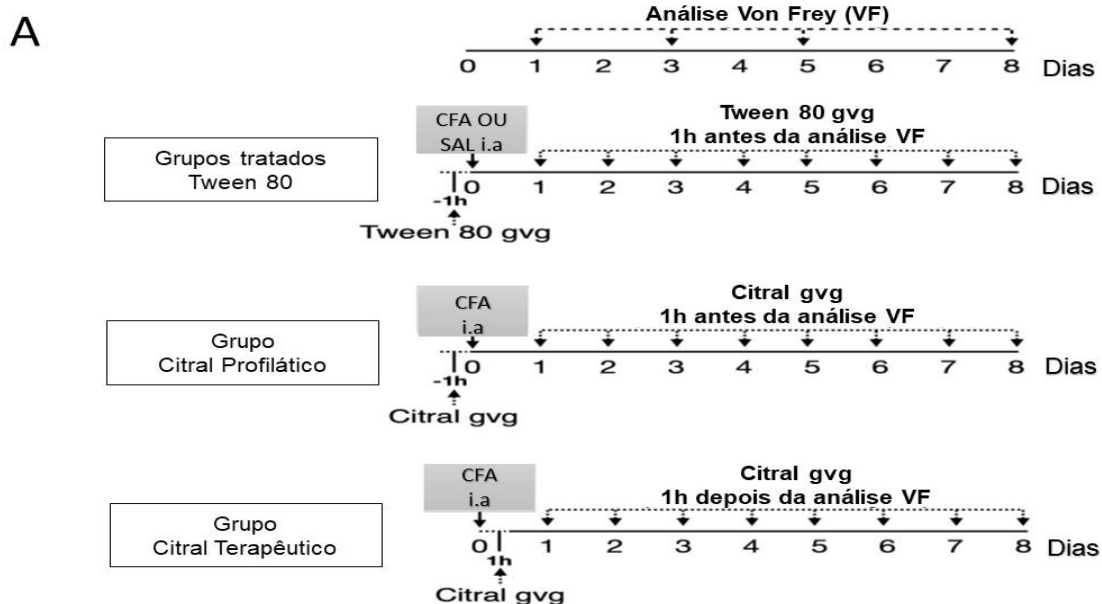


Figura 3A – Linha do tempo ilustrativa do experimento para avaliar o efeito profilático e terapêutico do citral na alodinia orofacial induzida por CFA.

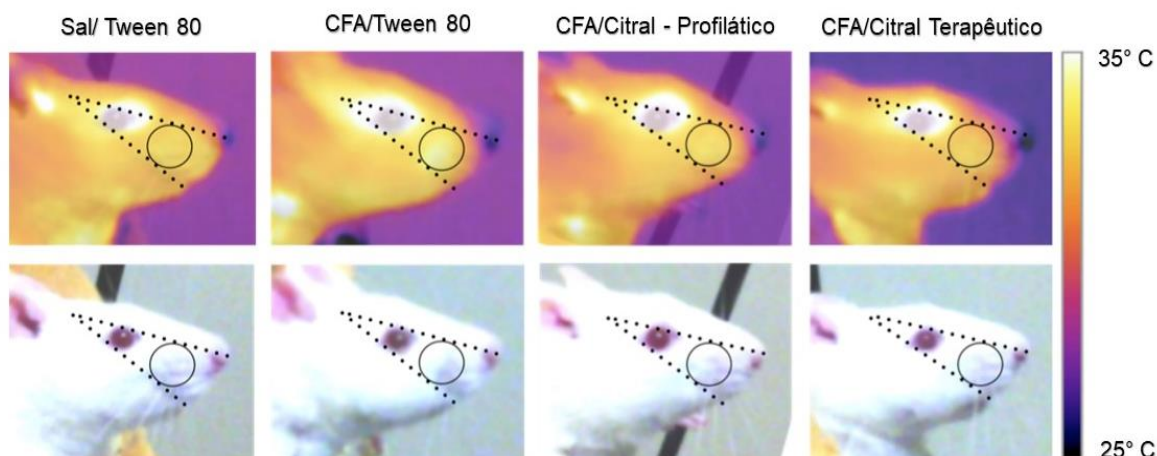


Figura 3B – As imagens termográficas mostram especificamente a área de vibrissas analisada dos ratos. Os círculos dentro dos retângulos foram o local onde as temperaturas locais foram medidas no primeiro dia após a administração do CFA i.a (fotos superiores). Simultaneamente, também foram tiradas fotos normais (fotos de baixo).

C

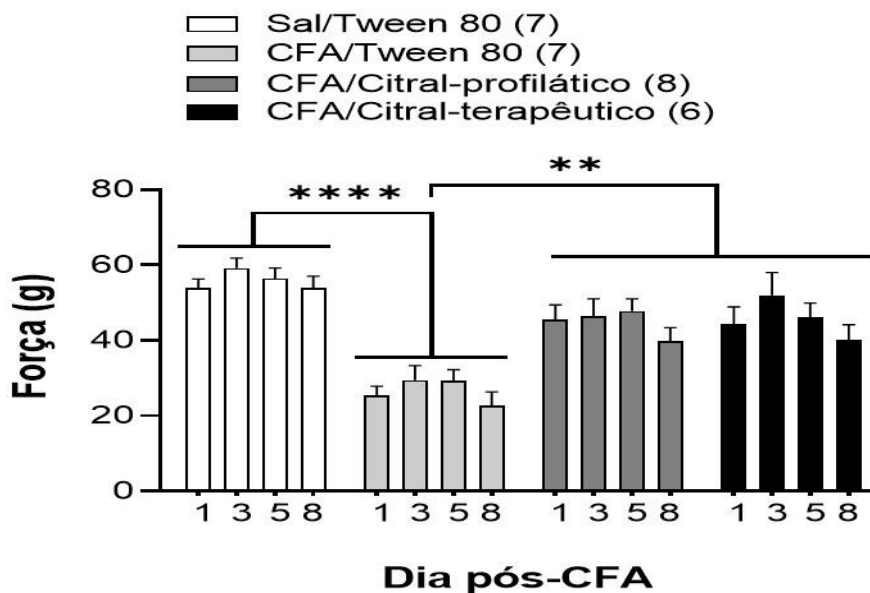


Figura 3C – Limiar mecânico orofacial (em gramas) após CFA com tratamento com citral ou administração de veículo dividido em profilático ou terapêutico. Os dados são apresentados como média \pm SEM. N (6-8). * $P \leq 0,05$, ** $P < 0,01$, **** $P < 0,0001$.

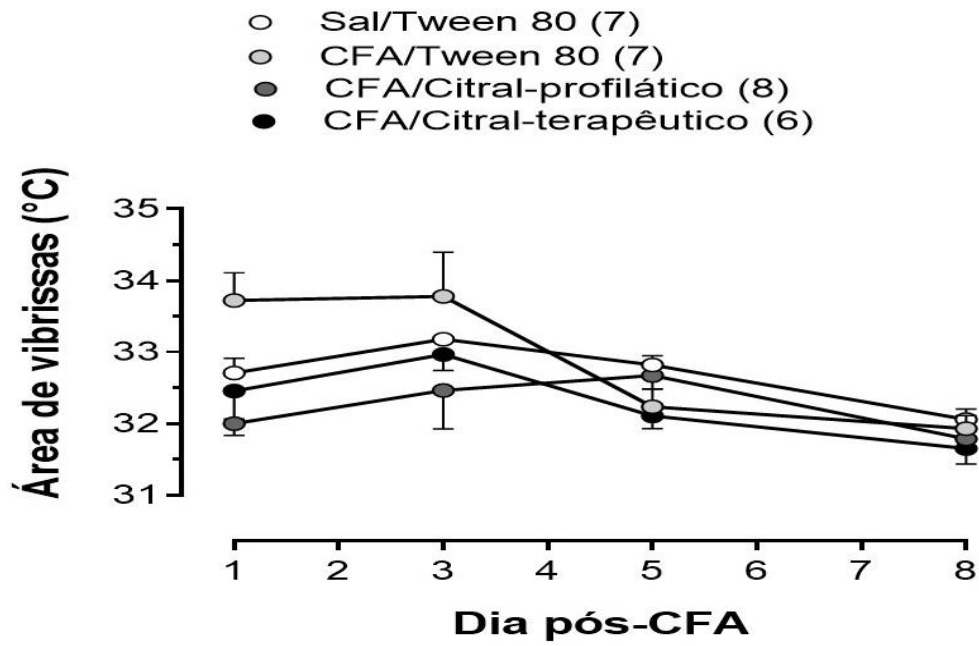
D

Figura 3D – Temperatura (°C) da região das vibrissas após CFA e tratamento profilático ou terapêutico com citral. Os dados são apresentados como média \pm SEM. N (6-8). * $P \leq 0,05$, ** $P < 0,01$, **** $P < 0,0001$.

Discussão

7 DISCUSSÃO

O presente estudo, empregou dois modelos de dor orofacial, um para a indução de hiperalgisia com a aplicação de formalina na região de vibrissas e outro para a indução de alodinia, por meio da injeção de CFA na ATM. No primeiro modelo foram utilizadas as concentrações de 100 ou 300 mg/kg de citral e no segundo modelo gavagem de citral na concentração de 100 mg/kg, sendo está dose profilático e terapêutico. O modelo experimental foi delineado com base nos trabalhos de Santos et al. (2019) e Emílio-Silva et al. (2017). Com isso, os resultados do presente estudo demonstram que: 1) O pré-tratamento com citral atenua a hiperalgisia inflamatória orofacial de forma dose-dependente; 2) O citral modula os níveis de citocinas na região orofacial de forma dose-dependente e 3) O citral atenua a alodinia inflamatória orofacial.

O citral é uma droga lipofílica instável em condições ácidas que modula uma variedade de processos celulares (WEERAWATANAKORN et al., 2015). Paralelamente, esse monoterpene apresenta baixa ou nenhuma capacidade tóxica em doses mais altas, sendo sua administração oral segura para longos períodos de tratamento (GONÇALVES et al., 2020). Quanto ao potencial antinociceptivo orofacial do citral, um estudo recente relatou o possível envolvimento dos canais potencial receptor transitório (TRP) em seu efeito, utilizando diferentes modelos murinos envolvendo administração de formalina, cinamaldeído, mentol ou capsaicina no lábio superior, bem como formalina injetada na região da articulação temporomandibular ou óleo de mostarda injetado no músculo masseter (ALVES RODRIGUES SANTOS et al., 2022).

Observamos inicialmente que o citral reduz o comportamento do animal de esfregar a face após o desafio com formalina. Durante a fase 1 do teste da formalina, a estimulação química dos terminais nociceptivos codifica informações sensoriais a serem transmitidas através do sistema nociceptivo trigeminal. Na fase 2, os mediadores inflamatórios estimulam as fibras nervosas (RABOISSON; DALLEL, 2004). Nesse cenário, é interessante notar que o citral reduz a resposta hipernociceptiva comportamental geral na fase 2 do teste da formalina (Fig. 1). De forma semelhante, Nishijima et al. (2014), observaram que a administração oral de citral reduz a hiperalgisia mecânica, uma característica clínica comum em pacientes com dor crônica, indicando o potencial do citral como uma nova droga para o tratamento da dor mediada pela medula espinhal. Com as informações disponíveis, pode-se sugerir que o citral tem um efeito antinociceptivo eficaz modulando a

transmissão de sinalização, não apenas através do sistema trigeminal, mas também de tecidos inervados pelo gânglio dorsal da medula espinhal (M. SANTOS et al., 2019).

A inflamação promove a ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B) e a expressão da ciclooxygenase-2 (COX-2), resultando na produção e liberação de citocinas pró e anti-inflamatórias (GONÇALVES et al., 2020). O efeito anti-inflamatório do citral é bem documentado na literatura para tratar algumas condições, como dores agudas e crônicas em animais (NISHIJIMA et al., 2014; MOTA et al., 2019). Neste sentido, o citral atua inibindo o NF- κ B e, conseqüentemente a produção e liberação de citocinas (GONÇALVES et al., 2020). Para entender se o efeito antinociceptivo do citral administrado sistemicamente atenua os sinais nociceptivos de entrada para o sistema trigêmeo por diminuir a liberação local de citocinas, avaliamos os níveis de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IFN- γ e IL-10, que estão envolvidas na transmissão de sinais nociceptivos agudos, no modelo formalina no tecido lesado em duas doses diferentes. O efeito antinociceptivo do citral foi dose-dependente no modelo da formalina (Fig. 2A) e, curiosamente, os mecanismos parecem ser dose-dependentes (Fig. 2B-E). A menor dose de citral causou diminuição nos níveis de IL 6 e IFN- γ no tecido lesado.

De modo interessante, o efeito antinociceptivo do citral parece estar relacionado ao aumento da produção de IL-10 com o uso de maior dose de citral no teste da formalina. Neste sentido, estudos anteriores revelam que o citral pode atuar em diferentes receptores, incluindo o TRP (GONÇALVES et al., 2020), enquanto que outras drogas têm como alvo um receptor específico ou outra determinada proteína embutida na membrana em uma faixa de concentração. Por outro lado, pode ter uma atividade diferente em outra faixa de concentração (LUNDBAEK, 2008). Este efeito inespecífico de algumas drogas, especialmente as lipofílicas, tem levado a potenciais divergências em estudos recentes, indicando assim a necessidade de uma melhor compreensão do efeito dessas drogas na estabilidade e composição da membrana em cada célula específica causando efeitos diferentes (BARRY et al., 2009). Aqui, fornecemos evidências de que o citral tem como alvo as citocinas, dependendo da dose usada em estímulos inflamatórios agudos na área orofacial. Ainda assim, mais estudos devem ser realizados para entender se esse efeito depende da lesão e do local.

Além do teste da formalina, a inflamação persistente na ATM induzida por CFA foi usada para verificar o possível efeito antinociceptivo do citral. Evidências

recentes mostram que o CFA induz inflamação da ATM e sinalização nociceptiva espinhal específica (MOTA et al., 2020). Adicionalmente, foi demonstrado que células imunes estão presentes nas membranas sinoviais de pacientes com osteoartrite com sinais de inflamação (LUO et al., 2020). Neste presente estudo mostra que o citral é capaz de reduzir a hipernocicepção da ATM em todos os dias avaliados (Fig. 3C).

Mudanças na temperatura local da pele (Fig. 3B) têm sido usadas para identificar neuropatias em humanos e animais (BENNETT; OCHOA, 1991; BRELSFORD; UEMATSU, 1985; CASAS-ALVARADO et al., 2020; GEROW et al., 1990; HÄBLER et al., 1998; PULST; HALLER, 1981; UEMATSU, 1985; UEMATSU et al., 1988; WAKISAKA; KAJANDER; BENNETT, 1991; ZAPROUDINA; MING; HÄNNINEN, 2006; Z. SACHARUK et al., 2011), mas nenhum trabalho avaliou a possível alteração da temperatura da região orofacial após a administração intra-articular de CFA, em modelo de hipernocicepção persistente. Para melhor visualização das possíveis alterações de temperatura orofacial induzidas pelo CFA, escolhemos a área das vibrissas, uma área com menos pelos e anatomicamente mais delimitada para ser analisada (Fig. 3B). Observamos que o CFA injetado na ATM causou indiretamente um aumento na temperatura na área das vibrissas, por pelo menos 24 horas após a injeção do CFA. O efeito da injeção de CFA na ATM eleva a temperatura em uma área não lesada mostrando o possível impacto indireto do CFA ao ativar o sistema trigeminal, causando aumento da temperatura da pele induzida por edema local na região das vibrissas. Este efeito indireto pode estar relacionado com a interação neuroimune bidirecional frente à resposta dolorosa (PINHO-RIBEIRO; VERRI; CHIU, 2017). Curiosamente, esse aumento na temperatura da pele da área das vibrissas foi abolido em ambos os tratamentos com citral, possivelmente pela redução das citocinas e conseqüentemente da inflamação (Fig. 3C). Coletivamente, os dados sugerem que o tratamento com citral, nos primeiros estágios da inflamação induzida por CFA é capaz, não só de reduzir a hipernocicepção persistente, mas também atenua o aumento da temperatura da pele induzido por CFA, na área orofacial ipsilateral não lesionada, provavelmente por modulação neuronal de moléculas, aumentando o edema e conseqüentemente a temperatura local.

Conclusão

8 CONCLUSÃO

Em resumo, este estudo fornece dados consistentes com a noção de que a administração oral de citral reduz tanto o comportamento nociceptivo induzido agudo (Fig. 1) quanto o crônico (Fig. 3) na região orofacial. Citral também reduziu a alodinia mecânica da ATM (Fig. 3), uma característica clínica comum durante a dor crônica. Os efeitos antinociceptivos do citral podem ser devidos a uma redução na liberação de mediadores inflamatórios (Fig. 2). Juntos, nossos dados indicam que a administração oral de citral pode ser considerada uma nova estratégia para o tratamento da dor orofacial.

Bibliografia

9 BIBLIOGRAFIA

ALVES RODRIGUES SANTOS, S. A. et al. Transient receptor potential channel involvement in antinociceptive effect of citral in orofacial acute and chronic pain models. **EXCLI Journal**, v. 21, p. 869–887, 24 jun. 2022.

ALVES, S. M. et al. Anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of strontium ranelate on the zymosan-induced temporomandibular joint inflammatory hypernociception in rats depend on TNF- α inhibition. **Pharmacological reports: PR**, v. 69, n. 4, p. 764–772, ago. 2017.

ANANTHAN, S.; BENOLIEL, R. Chronic orofacial pain. **Journal of Neural Transmission**, v. 127, n. 4, p. 575–588, abr. 2020.

AYOUB, S.; BERBÉRI, A.; FAYYAD-KAZAN, M. Cytokines, Masticatory Muscle Inflammation, and Pain: an Update. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 70, n. 5, p. 790–795, 1 maio 2020.

BARON, R. et al. A cross-sectional cohort survey in 2100 patients with painful diabetic neuropathy and postherpetic neuralgia: Differences in demographic data and sensory symptoms. **Pain**, v. 146, n. 1, p. 34–40, nov. 2009.

BARRY, J. et al. Determining the Effects of Lipophilic Drugs on Membrane Structure by Solid-State NMR Spectroscopy: The Case of the Antioxidant Curcumin. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 12, p. 4490–4498, 1 abr. 2009.

BASU, P. et al. *Euphorbia bicolor* (*Euphorbiaceae*) Latex Extract Reduces Inflammatory Cytokines and Oxidative Stress in a Rat Model of Orofacial Pain. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, p. e8594375, 12 set. 2019.

BEAUMONT, S. et al. Temporomandibular Disorder: a practical guide for dental practitioners in diagnosis and management. *Australian Dental Journal*, v. 65, n. 3, p. 172–180, set. 2020.

BELL, A. The neurobiology of acute pain. **The Veterinary Journal**, v. 237, p. 55–62, jul.

2018.

BENNETT, G. J.; OCHOA, J. L. Thermographic observations on rats with experimental neuropathic pain. **Pain**, v. 45, n. 1, p. 61–67, abr. 1991.

BHALANG, K. et al. Associations Among Four Modalities of Experimental Pain in Women. **The Journal of Pain**, v. 6, n. 9, p. 604–611, set. 2005.

BREIVIK, H. et al. Survey of chronic pain in Europe: Prevalence, impact on daily life, and treatment. **European Journal of Pain**, v. 10, n. 4, p. 287–287, maio 2006.

BRELSFORD, K. L.; UEMATSU, S. Thermographic presentation of cutaneous sensory and vasomotor activity in the injured peripheral nerve. **Journal of Neurosurgery**, v. 62, n. 5, p. 711–715, maio 1985.

CASAS-ALVARADO, A. et al. Advances in infrared thermography: Surgical aspects, vascular changes, and pain monitoring in veterinary medicine. **Journal of Thermal Biology**, v. 92, p. 102664, ago. 2020.

CHANG, C. et al. Functional disorders of the temporomandibular joints: Internal derangement of the temporomandibular joint. **The Kaohsiung Journal of Medical Sciences**, v. 34, n. 4, p. 223–230, abr. 2018.

CHICHORRO, J. G.; LORENZETTI, B. B.; ZAMPRONIO, A. R. Involvement of bradykinin, cytokines, sympathetic amines and prostaglandins in formalin-induced orofacial nociception in rats: Formalin-induced orofacial nociception. **British Journal of Pharmacology**, v. 141, n. 7, p. 1175–1184, abr. 2004.

COHEN, S. P.; VASE, L.; HOOTEN, W. M. Chronic pain: an update on burden, best practices, and new advances. **The Lancet**, v. 397, n. 10289, p. 2082–2097, 29 maio 2021.

COSTA, C. A. R. D. A. et al. The GABAergic system contributes to the anxiolytic-like effect of essential oil from *Cymbopogon citratus* (lemongrass). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 1, p. 828–836, set. 2011.

DE LEEUW, R. et al. Influence of Estrogen on Brain Activation During Stimulation With Painful Heat. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 64, n. 2, p. 158–166, fev. 2006.

DO NASCIMENTO, G. C.; LEITE-PANISSI, C. R. A. Time-dependent analysis of nociception and anxiety-like behavior in rats submitted to persistent inflammation of the temporomandibular joint. **Physiology & Behavior**, v. 125, p. 1–7, 10 fev. 2014.

DRAY, A. Neuropathic pain: emerging treatments. **British Journal of Anaesthesia**, v. 101, n. 1, p. 48–58, jul. 2008.

EMÍLIO-SILVA, M. T. et al. Antipyretic Effects of Citral and Possible Mechanisms of Action. **Inflammation**, v. 40, n. 5, p. 1735–1741, out. 2017.

FAYAZ, A. et al. Prevalence of chronic pain in the UK: a systematic review and meta-analysis of population studies. **BMJ Open**, v. 6, n. 6, p. e010364, maio 2016.

GARATTINI, E. G. et al. Propargylglycine decreases neuro-immune interaction inducing pain response in temporomandibular joint inflammation model. **Nitric Oxide**, v. 93, p. 90–101, 1 dez. 2019.

GAUER, R. L.; SEMIDEY, M. J. Diagnosis and Treatment of Temporomandibular Disorders. **American Family Physician**, v. 91, n. 6, p. 378–386, 15 mar. 2015.

GEROW, G. et al. Thermographic evaluation of rats with complete sciatic nerve transection. **Journal of Manipulative and Physiological Therapeutics**, v. 13, n. 5, p. 257–261, jun. 1990.

GONÇALVES, E. C. D. et al. Citral Inhibits the Inflammatory Response and Hyperalgesia in Mice: The Role of TLR4, TLR2/Dectin-1, and CB2 Cannabinoid Receptor/ATP-Sensitive K⁺ Channel Pathways. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 4, p. 1190–1200, 24 abr. 2020.

GONÇALVES, E. C. D. et al. Citral Inhibits the Inflammatory Response and Hyperalgesia in Mice: The Role of TLR4, TLR2/Dectin-1, and CB2 Cannabinoid Receptor/ATP-Sensitive K⁺ Channel Pathways. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 4, p. 1190–1200, 24 abr. 2020.

GREGORY, N. S. et al. An Overview of Animal Models of Pain: Disease Models and Outcome Measures. **The Journal of Pain**, v. 14, n. 11, p. 1255–1269, nov. 2013.

HÄBLER, H.-J. et al. Functional evidence for the differential control of superficial and deep blood vessels by sympathetic vasoconstrictor and primary afferent vasodilator fibres in rat hairless skin. **Experimental Brain Research**, v. 118, n. 2, p. 230–234, 19 jan. 1998.

HARGREAVES, K. M. Orofacial pain. **Pain**, v. 152, n. 3, p. S25–S32, mar. 2011.

HARRIOTT, A.; GOLD, M. Serotonin Type 1D Receptors (5HT_{1D} R) are Differentially Distributed in Nerve Fibres Innervating Craniofacial Tissues. **Cephalalgia**, v. 28, n. 9, p. 933–944, set. 2008.

HERRERO BABILONI, A. et al. Temporomandibular disorders cases with high-impact pain are more likely to experience short-term pain fluctuations. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 1657, 31 jan. 2022.

HYLANDS-WHITE, N.; DUARTE, R. V.; RAPHAEL, J. H. An overview of treatment approaches for chronic pain management. **Rheumatology International**, v. 37, n. 1, p. 29–42, jan. 2017.

JENSEN, T. S.; FINNERUP, N. B. Allodynia and hyperalgesia in neuropathic pain: clinical manifestations and mechanisms. **The Lancet Neurology**, v. 13, n. 9, p. 924–935, set. 2014.

JIANG, S. et al. Successful Reversal of Opioid-Induced Hyperalgesia and Allodynia with Duloxetine. **Pain Medicine (Malden, Mass.)**, v. 22, n. 4, p. 1010–1012, 20 abr. 2021.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, n. 6852, p. 203–210, set. 2001.

KRAMER, P. R.; BELLINGER, L. L. Modulation of temporomandibular joint nociception and inflammation in male rats after administering a physiological concentration of 17 β -oestradiol: Mechanisms of orofacial pain. **European Journal of Pain**, v. 17, n. 2, p. 174–184, fev. 2013.

KUNER, R.; KUNER, T. Cellular circuits in the brain and their modulation in acute and chronic pain. **Physiological Reviews**, v. 101, n. 1, p. 213–258, 1 jan. 2021.

LAVIGNE, G. J.; SESSLE, B. J. The Neurobiology of Orofacial Pain and Sleep and Their

Interactions. **Journal of Dental Research**, v. 95, n. 10, p. 1109–1116, set. 2016.

LEE, M. et al. A comprehensive review of opioid-induced hyperalgesia. **Pain Physician**, v. 14, n. 2, p. 145–161, 2011.

LEE, Y.; LEE, C.-H.; OH, U. Painful channels in sensory neurons. **Molecules and Cells**, v. 20, n. 3, p. 315–324, 31 dez. 2005.

LOESER, J. D.; MELZACK, R. Pain: an overview. **The Lancet**, v. 353, n. 9164, p. 1607–1609, 8 maio 1999.

LOESER, J. D.; TREEDE, R.-D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology ☆. **Pain**, v. 137, n. 3, p. 473–477, 31 jul. 2008.

LUNDBÆK, J. A. Lipid Bilayer–mediated Regulation of Ion Channel Function by Amphiphilic Drugs. **Journal of General Physiology**, v. 131, n. 5, p. 421–429, 1 maio 2008.

LUO, P. et al. IL-37 inhibits M1-like macrophage activation to ameliorate temporomandibular joint inflammation through the NLRP3 pathway. **Rheumatology**, v. 59, n. 10, p. 3070–3080, 1 out. 2020.

M. SANTOS, B. et al. Sex differences and the role of ovarian hormones in site-specific nociception of SHR. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 317, n. 2, p. R223–R231, 1 ago. 2019.

MA, Y. et al. Resveratrol alleviates temporomandibular joint inflammatory pain by recovering disturbed gut microbiota. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 87, p. 455–464, jul. 2020.

MAEGAWA, H. et al. Bilateral Parkinson's disease model rats exhibit hyperalgesia to subcutaneous formalin administration into the vibrissa pad. **PLOS ONE**, v. 14, n. 12, p. e0225928, de dez de 2019.

MANGPRAYOOL, T.; KUPITTAYANANT, S.; CHUDAPONGSE, N. Participation of citral in the bronchodilatory effect of ginger oil and possible mechanism of action. **Fitoterapia**, v. 89, p. 68–73, set. 2013.

MARTINEZ-GARCIA, M.; MIGUELANEZ-MEDRAN, B.; GOICOECHEA, C. Animal models in the study and treatment of orofacial pain. **Journal of Clinical and Experimental Dentistry**, p. 0–0, 2019.

MCCARTHY, L. H. et al. Chronic Pain and Obesity in Elderly People: Results from the Einstein Aging Study: CHRONIC PAIN AND OBESITY IN ELDERLY PEOPLE. **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 57, n. 1, p. 115–119, jan. 2009.

MEINTJES, R. A. An overview of the physiology of pain for the veterinarian. **The Veterinary Journal**, v. 193, n. 2, p. 344–348, ago. 2012.

MILAM, S. B.; ZARDENETA, G.; SCHMITZ, J. P. Oxidative stress and degenerative temporomandibular joint disease: A proposed hypothesis. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 56, n. 2, p. 214–223, fev. 1998.

MOTA, C. M. D. et al. Citral-induced analgesia is associated with increased spinal serotonin, reduced spinal nociceptive signaling, and reduced systemic oxidative stress in arthritis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 250, p. 112486, mar. 2020.

NICOL, G. D.; LOPSHIRE, J. C.; PAFFORD, C. M. Tumor Necrosis Factor Enhances the Capsaicin Sensitivity of Rat Sensory Neurons. **Journal of Neuroscience**, v. 17, n. 3, p. 975–982, 1 fev. 1997.

NISHIJIMA, C. M. et al. Citral: A monoterpene with prophylactic and therapeutic anti-nociceptive effects in experimental models of acute and chronic pain. **European Journal of Pharmacology**, v. 736, p. 16–25, ago. 2014.

OKADA, S. et al. Differential activation of ascending noxious pathways associated with trigeminal nerve injury. **Pain**, v. 160, n. 6, p. 1342–1360, jun. 2019.

OKAMOTO, K. et al. Bright light activates a trigeminal nociceptive pathway. **Pain**, v. 149, n. 2, p. 235–242, maio 2010.

PATEL, N. M.; JOZSA, F.; M DAS, J. Neuroanatomy, Spinal Trigeminal Nucleus. In: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023.

PAUL-SAVOIE, E. et al. The Impact of Pain Invisibility on Patient-Centered Care and Empathetic Attitude in Chronic Pain Management. **Pain Research and Management**, v. 2018, p. 1–8, 24 set. 2018.

PINHO-RIBEIRO, F. A.; VERRI, W. A.; CHIU, I. M. Nociceptor Sensory Neuron–Immune Interactions in Pain and Inflammation. **Trends in Immunology**, v. 38, n. 1, p. 5–19, jan. 2017.

PULST, ST.-M.; HALLER, P. Thermographic assessment of impaired sympathetic function in peripheral nerve injuries. **Journal of Neurology**, v. 226, n. 1, p. 35–42, set. 1981.

RABOISSON, P.; DALLEL, R. The orofacial formalin test. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 28, n. 2, p. 219–226, abr. 2004.

RABOISSON, P.; DALLEL, R. The orofacial formalin test. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 28, n. 2, p. 219–226, abr. 2004.

ROTPENPIAN, N.; YAKKAPHAN, P. Review of Literatures: Physiology of Orofacial Pain in Dentistry. **eneuro**, v. 8, n. 2, p. ENEURO.0535-20.2021, mar. 2021.

SANTIN, M. R. et al. In vitro activity of the essential oil of *Cymbopogon citratus* and its major component (citral) on *Leishmania amazonensis*. **Parasitology Research**, v. 105, n. 6, p. 1489–1496, nov. 2009.

SEADI PEREIRA, P. J. et al. Nociceptive and inflammatory responses induced by formalin in the orofacial region of rats: Effect of anti-TNF α strategies. **International Immunopharmacology**, v. 9, n. 1, p. 80–85, jan. 2009.

SESSLE, B. J. Mechanisms of oral somatosensory and motor functions and their clinical correlates*. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 33, n. 4, p. 243–261, abr. 2006.

ŠKLEBAR, D. et al. Neuropathic orofacial pain – diagnostic and therapeutic challenges. **Periodicum biologorum**, v. 117, n. 2, p. 231–237, 10 jun. 2015.

SONG, Y. et al. Effects of Citral on Lipopolysaccharide-Induced Inflammation in Human

- Umbilical Vein Endothelial Cells. **Inflammation**, v. 39, n. 2, p. 663–671, abr. 2016.
- TECCO, S.; BALLANTI, F.; BALDINI, A. New Frontiers in Orofacial Pain and Its Management. **Pain Research and Management**, v. 2018, p. e6286717, 17 set. 2018.
- TERRIER, L.-M.; HADJIKHANI, N.; DESTRIEUX, C. The trigeminal pathways. **Journal of Neurology**, v. 269, n. 7, p. 3443–3460, jul. 2022.
- TOFIÑO-RIVERA, A. et al. Effect of Lippia alba and Cymbopogon citratus essential oils on biofilms of Streptococcus mutans and cytotoxicity in CHO cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 194, p. 749–754, dez. 2016.
- UEMATSU, S. et al. Quantification of thermal asymmetry: Part 2: Application in low-back pain and sciatica. **Journal of Neurosurgery**, v. 69, n. 4, p. 556–561, out. 1988.
- UEMATSU, S. Thermographic imaging of cutaneous sensory segment in patients with peripheral nerve injury: Skin-temperature stability between sides of the body. **Journal of Neurosurgery**, v. 62, n. 5, p. 716–720, maio 1985.
- VOS, T. et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **The Lancet**, v. 390, n. 10100, p. 1211–1259, set. 2017.
- VRANKEN, J. H. et al. Duloxetine in patients with central neuropathic pain caused by spinal cord injury or stroke: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Pain**, v. 152, n. 2, p. 267–273, fev. 2011.
- WAKISAKA, S.; KAJANDER, K. C.; BENNETT, G. J. Abnormal skin temperature and abnormal sympathetic vasomotor innervation in an experimental painful peripheral neuropathy. **Pain**, v. 46, n. 3, p. 299–313, set. 1991.
- WEERAWATANAKORN, M. et al. Reactivity and stability of selected flavor compounds. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 23, n. 2, p. 176–190, jun. 2015.
- WU, Y.-W. et al. 17-β-Estradiol Enhanced Allodynia of Inflammatory Temporomandibular

Joint through Upregulation of Hippocampal TRPV1 in Ovariectomized Rats. **Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 26, p. 8710–8719, 30 jun. 2010.

Z. SACHARUK, V. et al. Thermographic evaluation of hind paw skin temperature and functional recovery of locomotion after sciatic nerve crush in rats. **Clinics**, v. 66, n. 7, p. 1259–1266, jul. 2011.

ZAPROUDINA, N.; MING, Z.; HÄNNINEN, O. O. P. Plantar Infrared Thermography Measurements and Low Back Pain Intensity. **Journal of Manipulative and Physiological Therapeutics**, v. 29, n. 3, p. 219–223, mar. 2006.

Anexos



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

Ribeirão Preto, 24 de maio de 2021.

Ilmo. Sr.
Prof. Dr. **Francisco Wanderley Garcia de Paula e Silva**
DD. Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais
FORP/USP

Ref.: Processo 2019.1.36.58.7

Prezado Senhor Coordenador,

Respeitosamente, solicito alteração da vigência do projeto “Análise do efeito do Citral na sensibilidade nociceptiva orofacial”, porque alguns protocolos experimentais apresentaram resultados pouco consistentes, exigindo que sejam repetidos.

Nosso grupo deverá contar com a Ac. Isabelly Gomes Solon, para que estes experimentos sejam repetidos.

Deste modo, solicitamos um montante adicional de 40 ratos que deverão permitir que o projeto seja conduzido à termo, testando-se a hipótese que o citral é um potencial analgésico não somente para dor sistêmica, mas também para dor orofacial. Se provada a hipótese, este projeto fornecerá evidências de uma nova terapêutica de origem natural para patologias de dor orofacial.

Por fim, solito que a data final para envio do relatório 01/09/2022, quando se encerra também a bolsa da Ac. Isabelly Solon.

Atenciosamente,

Luiz Guilherme de Siqueira Branco
Professor Titular

