

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA BÁSICA E ORAL**

**DANIELA MARIA ESCOBAR ESPINAL**

**VERSÃO CORRIGIDA**

**Canabinoides previnem nocicepção na neuralgia trigeminal via  
receptores TRPV1**

**RIBEIRÃO PRETO**

**2023**

**DANIELA MARIA ESCOBAR ESPINAL**

**Canabinoides previnem nocicepção na neuralgia trigeminal via  
receptores TRPV1**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão  
Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de  
Mestre em Ciências

**Área de concentração:** Biologia Oral  
**Orientadora:** Profa. Dra. Glauce Crivelaro do Nascimento

**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 à fonte.

## FICHA CATALOGRÁFICA

**Escobar-Espinal, Daniela Maria**

Canabinoides previnem nocicepção na neuralgia trigeminal via receptores TRPV1. Ribeirão Preto, 2023.

89p. : il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biologia Oral.

VERSÃO CORRIGIDA

Orientadora: Glauce Crivelaro do Nascimento

1. Neuralgia Trigeminal. 2. Canabidiol. 3. Núcleo espinal do trigêmeo.  
4. Receptores TRPV1. 5. Carbamazepina

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Escobar-Espinal, Maria Daniela. Canabinoides previnem nocicepção na neuralgia trigeminal via receptores TRPV1

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de  
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção  
do Título de Mestre em Ciências

Aprovada em: \_\_\_\_\_.

### BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra.

Instituição:

Assinatura: \_\_\_\_\_

Profa. Dra.

Instituição:

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr.

Instituição:

Assinatura: \_\_\_\_\_

“Não é porque as coisas são difíceis que não nos arriscamos, é porque não nos arriscamos  
que elas se tornam difíceis”

Senéca

“Thinking like a scientist involves more than just reacting with an open mind. It means  
being actively open-minded. It requires searching for reasons why we might be wrong—not  
for reasons why we must be right—and revising our views based on what we learn.”

Adant Grant

Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo propósito debaixo do céu.

Eclesiastes 3:1.

*As mulheres que me inspiraram  
Minha avó, minha mãe e minhas tias  
Mulheres lutadoras, corajosas, profissionais  
Vocês me ensinaram o valor das oportunidades,  
dos bons momentos, do sofrimento, do  
trabalho.  
É a vocês que devo quem me tornei hoje.*

## AGRADECIMENTOS

*Foram muitos anos de esforço para finalmente me encontrar aqui, neste pequeno fragmento do meu trabalho, passando diante dos meus olhos, todas as pessoas que formaram parte do que foi apenas um sonho, e hoje a minha realidade.*

*Desde o ano de 2013 (e me lembro bem disso), o Brasil se tornou o meu sonho. Foi nesse momento que, durante minha graduação, comecei a me preparar para essa oportunidade. Justo quando acreditei que era o momento certo para realizar esse sonho, a pandemia chegou, trazendo tempos difíceis para todos nós. No entanto, isso não me fez desistir. Durante esse período, foram inúmeras noites sem dormir, muito trabalho e várias pessoas que aceitaram fazer parte do meu caminho e compartilhar dos anseios do meu coração, até que um dia fosse possível. Além disso, não posso esquecer das pessoas que estiveram ao meu lado durante o mestrado, contribuindo para o meu crescimento e me ajudaram a chegar até aqui. Por isso, eu quero neste trabalho agradecer-lhes.*

*Ao criador, que colocou esse sonho no meu coração e foi o meu guia em todo momento para torná-lo possível. Desejo que a minha fé permaneça firme na tua vontade.*

*A minha mãe, a mulher que me ensinou a ser forte e decidida, que continua sendo um pilar fundamental na minha vida, proporcionando-me a motivação e a coragem necessárias para enfrentar cada desafio. Sou imensamente grata por seu esforço para que eu possa visitá-la a cada ano. Meu mais sincero e profundo agradecimento por cada palavra e conselho que nunca me faltaram. Mesmo estando longe, a sua presença faz com que a distância e a saudade sejam menos dolorosas. Obrigada por ser a minha inspiração e apoio incondicional. Te amo muito, mãe.*

*A minha família, que estiveram sempre presentes, me lembrando constantemente do quanto se sentem felizes com as minhas conquistas e que sempre haverá um cantinho no mundo que me pertence, e é meu lar. Os amo.*

*A minha orientadora Professora Glauce, o meu maior presente que eu ganhei do Brasil, você foi essencial durante minha formação acadêmica e também foi muito importante em meu crescimento pessoal. Professora e amiga, que me ensinou que tudo pode ser ensinado e aprendido com amor e paciência. Minha admiração pelo seu desempenho como professora e paixão pela pesquisa. Sou imensamente grata por ter sido sua aluna de mestrado, pela confiança que depositou em mim e pelas valiosas lições que, sem dúvida*



*alguma, nunca esquecerei e sempre colocarei em prática. Pela sua dedicação durante este tempo, pelos abraços sinceros, pelo ajuda incondicional e os bons momentos.*

*A professora Elaine Del-Bel, a quem agradeço imensamente por ter aberto as portas do seu laboratório para mim. A quem também admiro pela sua história e árduo trabalho na pesquisa. Também desempenhou um papel muito importante no meu aprendizado acadêmico, no desenvolvimento da minha carreira como pesquisadora e na intensificação da minha paixão pela ciência. Seu respeito, carinho e cuidado que recebi sempre foram inestimáveis. Muito obrigada por todo o suporte e oportunidade que me concedeu.*

*À minha querida Celinha, a quem chamo de minha vovó brasileira, expresso minha profunda gratidão pelo seu cuidado e ajuda, pelas vezes que me chamou atenção com carinho, e pelas palavras de incentivo e paciência na minha jornada acadêmica. Os cafés no postinho e as risadas matinais são momentos agradáveis que guardo no meu coração. Sua sinceridade e autenticidade como pessoa são qualidades que admiro imensamente. Estimo você, Celinha, mais do que palavras podem expressar.*

*Ao professor Mauricio, admiro muito você como profissional, considerando-o uma pessoa muito inteligente, empenhada e paciente. Agradeço pela sua colaboração em meu aprendizado e pelos dias que dedicou do seu tempo para tornar possíveis algumas técnicas empregadas neste trabalho. Sinto muitas saudades.*

*A minha colega Airam, sou imensamente grata por ter dedicado o seu tempo e compartilhado suas habilidades e conhecimento técnico para o meu desenvolvimento neste trabalho. Obrigada por sua generosidade e apoio constante.*

*Ao professor João Francisco pelo seu sincero carinho, os cafés e valiosas discussões no laboratório, aportações que foram muito importantes durante minha evolução científica.*

*Ao Professor Francisco Guimãraes quem foi o fornecedor das drogas do Canabidiol e HUF-101. Sua contribuição foi fundamental para o sucesso deste trabalho. Muito obrigada pelo apoio.*

*Aos meus amigos do laboratório Núbia, Bianca, Thais, Rafaela, Leonardo, Lorena e alunos de IC, que formaram parte do meu processo de mestrado com risadas do dia a dia, meu sincero agradecimento por tornarem os dias desafiadores da pós-graduação, mais amenos. Assim como também recebi de vocês muita ajuda para o desenvolvimento deste trabalho. Eu levo comigo momentos muito especiais e significativos.*

*Aos meus irmãos brasileiros Lyzandra e Fabio, quando eu cheguei pela primeira vez no Brasil, vocês me receberam de braços abertos, proporcionando um lar acolhedor e um colo para chorar. Os cafés da manhã com risadas e fofocas se tornaram momentos especiais e reconfortantes. Agradeço por cuidarem de mim quando estive doente e por sempre me fazerem sentir que não estava sozinha. Seus apoios financeiro e emocional foram essenciais e fundamentais ao longo deste processo, tornando-o menos difícil.*

*As minhas melhores amigas Monica e Gissela, aquelas que conheço desde a faculdade e que somos melhores amigas até hoje, quero expressar meu profundo agradecimento por estarem ao meu lado todos os dias. Suas mensagens diárias, as ligações por vídeo, os conselhos sinceros e o apoio constante fazem com que eu me sinta como se tivesse vocês pertinho de mim.*

*Ao professor Marcio Belotti por ter me concedido esta oportunidade. A professora Karina Fittipaldi por ter sido sempre atenciosa. A Imaculada e Mauro Leoni, que sempre estiveram prontos a me ajudar sempre que necessitei.*

*Aos professores, colegas e amigos que formaram parte do meu processo antes de chegar no Brasil que sempre confiaram em mim e me deram todo seu apoio.*

*A CAPES e demas agências de fomento pela concessão de bolsa de mestrado e apoio financeiro.*

*A Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto e o programa de pós-graduação em Biologia Oral por terem me proporcionado a oportunidade de fazer parte como aluna de mestrado de uma instituição tão prestigiosa.*

*A OEA, muito obrigada pela oportunidade que é oferecida a alunos de países com baixo desenvolvimento científico, que nos permite sair do país para buscar aprimorar nossos conhecimentos e habilidades em instituições de excelência, além de possibilitar uma troca enriquecedora de experiências.*

*Migrar do país não é fácil, mas eu não me arrependo, o crescimento pessoal que eu ganhei até agora, faz parte também desta conquista.*

## RESUMO

Escobar-Espinal, Daniela Maria **Canabinoides previnem nociceção na neuralgia trigeminal via receptores TRPV1** 2023. 89f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023

A neuralgia trigeminal (TN) é uma dor orofacial altamente intensa e debilitante. O tratamento padrão ouro para a TN é a carbamazepina. Este medicamento antiepilético proporciona alívio da dor, mas permanece sendo um dos maiores desafios terapêuticos devido ao número de efeitos colaterais. Para estudar o potencial antinociceptivo do canabidiol (CBD) e seu análogo fluorado PECS-101 (anteriormente HUF-101), uma lesão crônica unilateral por constrição do nervo infraorbital (IoN-CCI) em ratos Wistar machos foi realizada. Sete dias de tratamento com CBD (30 mg/kg), PECS-101 (3, 10 e 30 mg/kg) ou carbamazepina (10 e 30 mg/kg) reduziram as respostas à alodinia e hiperaglesia. Ao contrário da carbamazepina, o CBD e o PECS-101 não prejudicaram a atividade motora. O alívio das respostas de hipersensibilidade é associado à modulação do receptor potencial transitório de vanilóide tipo 1 (TRPV1) no núcleo espinal trigeminal. O CBD (30 mg/kg) e o PECS-101 (10 e 30 mg/kg) reverteram a expressão aumentada do TRPV1 induzida pelo IoN-CCI nesta região. Usando uma estratégia farmacológica, estabelecemos uma combinação do antagonista seletivo do TRPV1 (capsazepina - CPZ - 5 mg/kg) com doses subeficazes de CBD (3 e 10 mg/kg), esta combinação foi capaz de reverter as respostas de alodinia e hiperaglesia induzidas pelo IoN-CCI. Esse efeito foi acompanhado por uma redução na expressão de proteína TRPV1 no núcleo espinal trigeminal. Nossos resultados sugerem que o CBD e o PECS-101 podem beneficiar a neuralgia trigeminal sem causar comprometimento da coordenação motora. O PECS-101 foi mais potente contra as respostas hiperconciptivas e de comprometimento motor induzidas pela TN em comparação com o CBD e a carbamazepina. O efeito antinociceptivo desses canabinoides é, pelo menos em parte, mediado pelos receptores TRPV1 na parte caudal do núcleo espinal trigeminal, a primeira estação de processamento da dor orofacial no sistema nervoso central.

**Palavras chaves:** Dor orofacial, Neuralgia Trigeminal, TRPV1, Canabinoides, Subnúcleo caudal espinal do trigêmeo

## ABSTRACT

Escobar-Espinal, DM. 2023. **Cannabinoids prevent nociception in trigeminal neuralgia via TRPV1 receptors**. 89f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023

Trigeminal neuralgia (TN) is a highly intense and debilitating orofacial pain. The gold standard treatment for TN is carbamazepine. This antiepileptic drug provides pain relief but remains one of the most significant therapeutic challenges because of the number of severe side effects reactions. To study the antinociceptive potential of cannabidiol (CBD) and its fluorinated analog PECS-101 (former HUF-101), we used a unilateral chronic constriction injury of the infraorbital nerve (IoN-CCI) in male Wistar rats. Seven days of treatment with CBD (30 mg/kg), PECS-101 (3, 10, and 30 mg/kg), or carbamazepine (10 and 30 mg/kg) reduced allodynia and hyperalgesia responses. Unlike carbamazepine, CBD and PECS-101 did not impair motor activity. The relief of the hypersensitive reactions has been associated with transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) modulation in the trigeminal spinal nucleus. CBD (30 mg/kg) and PECS-101 (10 and 30 mg/kg) reversed the increased expression of TRPV1 induced by IoN-CCI in this nucleus. Using a pharmacological strategy, we established that a combination of the selective TRPV1 antagonist (capsazepine - CPZ – 5 mg/kg) with sub-effective doses of CBD (3 and 10 mg/kg) is also able to reverse the IoN-CCI-induced allodynia and hyperalgesia responses. This effect was accompanied by reduced TRPV1 protein expression in the trigeminal spinal nucleus. Our results suggest that CBD and PECS-101 may benefit trigeminal neuralgia without causing adverse motor coordination impairments. PECS-101 was more potent against the hypernociceptive and motor impairment responses induced by TN compared to CBD and carbamazepine. The antinociceptive effect of these cannabinoids is, at least in part, mediated by TRPV1 receptors in the caudal part of the trigeminal spinal nucleus, the first station of orofacial pain processing in the central nervous system.

**Key words:** Orofacial Pain, Trigeminal Neuralgia, TRPV1, Cannabinoids, Spinal Trigeminal Nucleus

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**AEA** – Anandamida

**ANOVA** – Análise de variância

**ATM** – Articulação Temporomandibular

**ATP** – Adenosina Trifosfato

**BH** – Barreira Hematoencefálica

**BoNT-A** – Toxina Botulínica do tipo A

**CA<sup>2+</sup>** - Íon Cálcio

**CB1** – Receptor endocanabinoide 1

**CB2** - Receptor endocanabinoide 2

**CBD** – Canabidiol

**CBZ** – Carbamazepina

**CETEA** - Comitê de Ética em Experimentação Animal

**CPZ** - Capsazepina

**CCI** – Constrição Crônica

**CONCEA** - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

**DON** – Dor Orofacial Neuropática

**DRG** - Gânglio da Raiz Dorsal

**SECB** – Sistema Endocanabinoide

**EPM** – Erro Padrão da Média

**FAAH** – Amida hidrolase de ácido graso

**FORP** – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto

**g** - Gramas

**GCPR** – Receptor associado a proteína G

**GlyR** - Receptor de Glicina

**GT** - Gânglio Trigeminal

**IASP** - Associação Internacional para Estudo da Dor

**IHS** - International Headache Society

**i.p.** - Intraperitoneal

**IoN** - Nervo Infraorbitário

**K+** - Potássio

**kg** – Quilogramas

**ml** - Mililitros

**mm** – Milímetros

**NA+** - Sódio

**Nav**– Canais de voltagem de Sódio

**NT** – Neuralgia Trigeminal

**PAG** - Substância Cinzenta Periaquedutal

**PPARs** - Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma

**pSNL** - Lesão Parcial do Nervo Isquiático

**RTX** - Resiniferatoxina

**SNC** - Sistema Nervoso Central

**SNP** - Sistema Nervoso Periférico

**Sp5c** - Subnúcleo Espinhal Caudal do Trígêmeo

**THC** - Delta-9-Tetrahydrocannabinol

**TRP** - Potencial Receptor Transiente

**TRPV1** - Receptores transitórios 1 da subfamília V do canal de cátions

**USP** – Universidade de São Paulo

**VR1** - Receptor Vaniloide tipo 1

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Vias relacionadas na transmissão da dor na neuralgia trigeminal .....	26
<b>Figura 2:</b> Estrutura do CBD e PECS-101 (HUF-101) .....	29
<b>Figura 3:</b> Ilustração representativa da cirurgia para constrição do nervo infraorbitário (IoN-CCI).....	42
<b>Figura 4:</b> Analgesímetro digital para modelo nociceptivo comportamental Von Frey (Insight).....	43
<b>Figura 5:</b> Modelo nociceptivo comportamental Formalina .....	44
<b>Figura 6:</b> Teste para avaliação de coordenação motora do animal .....	45
<b>Figura 7:</b> Coleta do subnúcleo caudal do núcleo espinal do trigêmeo (Sp5c).....	46
<b>Figura 8:</b> Desenho experimental e protocolo geral de avaliação de testes nociceptivos mecânico em animais tratados com CBD, HUF e CBZ .....	49
<b>Figura 9:</b> Desenho experimental e protocolo geral de avaliação de testes nociceptivos mecânico em animais tratados com CBD + CPZ .....	50
<b>Figura 10:</b> Resposta farmacológica do CBD, PECS-101 e Carbamazepina sobre a alodinia mecânica orofacial .....	55



**Figura 11:** Resposta farmacológica do CBD, PECS-101 e Carbamazepina sobre a hiperalgesia orofacial .....58

**Figura 12:** Análise de expressão de proteína TRPV1 no subnúcleo caudal do núcleo espinal do trigêmeo .....60

**Figura 13:** Resposta farmacológica da associação de antagonista de TRPV1 com doses subefetivas de CBD sobre a alodinia mecânica, hiperalgesia e expressão de proteína TRPV1 no subnúcleo caudal do núcleo espinal do trigêmeo .....62

**Figura 14:** Resposta Farmacológica do CBD, PECS-101 e Carbamazepina sobre a coordenação motora .....64

**Figura 15:** Desenho esquemático sobre o mecanismo hipotético pelo qual CBD e CPZ reduzem a resposta nociceptiva no modelo de IoN-CCI.....75

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Lista de materiais necessários para realização dos experimentos .....	35
<b>Tabela 2</b> - Lista de reagentes necessários para o preparo e diluição de drogas utilizadas no tratamento dos animais e realização dos estudos comportamentais .....	35
<b>Tabela 3</b> - Lista de instrumentos utilizados no decorrer dos experimentos .....	37
<b>Tabela 4</b> - Lista de reagentes necessários para realização de Western Blotting .....	38
<b>Tabela 5</b> - Lista de substâncias necessárias para realização de Western Blotting .....	38
<b>Tabela 6</b> - Lista de materiais utilizados para realização do Western Blotting .....	39
<b>Tabela 7</b> - Lista de tampões e soluções utilizados para realização de Western Blotting .....	40
<b>Tabela 8</b> – Lista de drogas e concentrações utilizadas no experimento .....	42
<b>Tabela 9</b> - Limiar de retirada de cabeça –alodinia mecânica –Von Frey .....	56
<b>Tabela 10</b> – Resposta hiperalgésica orofacial – Teste da Formalina .....	59

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS .....	8
RESUMO .....	11
ABSTRACT .....	12
LISTA DE ABREVIATURAS .....	13
LISTA DE FIGURAS .....	16
LISTA DE TABELAS .....	18
<b>I. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>20</b>
I-1. DOR NEUROPÁTICA TRIGEMINAL .....	21
I-2. MODELOS ANIMAIS .....	23
I-3. TRANSMISSÃO DA INFORMAÇÃO DOLOROSA OROFACIAL .....	24
I-4. CANABINOIDES E ANALGESIA .....	26
I-5. O RECEPTOR DE POTENCIAL TRANSIENTE VANILÓIDE 1 (TRPV1) .....	29
I-6. HIPÓTESE .....	31
<b>II. OBJETIVOS .....</b>	<b>32</b>
II-1. OBJETIVOS GERAIS .....	33
II-2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	33
<b>III. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>34</b>
III.1 MATERIAIS UTILIZADOS .....	35
III-2. MÉTODOS .....	40
III-2.1. ANIMAIS .....	40
III-2.2. MODELO DE NEURALGIA .....	41
III-2.3. TESTES NOCICEPTIVOS OROFACIAIS .....	42
III-2.4. TESTE COMPORTAMENTAL MOTOR .....	44
III-2.5. EUTANÁSIA, COLETA E PROCESSAMENTO DE TECIDOS .....	45
III-2.6. WESTERN BLOTTING .....	46
III-2.7. CÁLCULO AMOSTRAL / DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....	47
III-2.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	47
III-2.9. LINHAS EXPERIMENTAIS .....	48
III-2.10. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS .....	50
<b>IV. RESULTADOS .....</b>	<b>53</b>
IV-1. IoN-CCI provoca alodinia mecânica orofacial e os canabinóides previnem esta resposta .....	54
IV-2. IoN-CCI provoca hiperalgisia orofacial e os canabinóides previnem esta resposta .....	56
IV-3. O CBD e o PECS-101 reduzem a nocicepção induzida por IoN-CCI ao atuarem na expressão do receptor TRPV1 no Subnúcleo caudal do Núcleo Espinal do Trigêmeo (Sp5c) .....	59
IV-4. A associação de um antagonista seletivo do TRPV1 (Capsazepina) com doses subefetivas de CBD atenua a alodinia mecânica e a hiperalgisia orofacial induzidas por IoN-CCI .....	61
IV-5. Influência do CBD, PECS-101, Carbamazepina e da associação CPZ/CBD na coordenação motora .....	63
<b>V. DISCUSSÃO .....</b>	<b>66</b>
<b>VI. CONCLUSÃO .....</b>	<b>76</b>
<b>VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>798</b>
<b>VIII. APÊNDICE .....</b>	<b>92</b>

# I. INTRODUÇÃO

---

---

## **I-INTRODUÇÃO**

### **I-1. DOR NEUROPÁTICA TRIGEMINAL**

Dor Orofacial Neuropática (DON) é uma condição dolorosa crônica que pode afetar cabeça, face e pescoço, associada com a disfunção e lesões primárias do sistema nervoso (Hossain et al., 2020; McDonough et al., 2014). A neuralgia trigeminal (NT) é o tipo mais comum de dor neuropática (Kumar et al., 2013), e de acordo com a International Headache Society (IHS), a NT é definida como "um distúrbio caracterizado por uma dor breve e recorrente, unilateral, semelhante a um choque elétrico, de início e término abruptos, limitada à distribuição de uma ou mais divisões do nervo trigêmeo e desencadeada por estímulos inócuos". A classificação da NT conforme estabelecido pela IHS é dividida de acordo com a causa dessa condição: 1) NT clássica, por trauma ou compressão da raiz do nervo trigêmeo, 2) NT secundária, causada por uma doença subjacente ou procedimentos odontológicos, incluindo tumores, trauma, infecção viral e esclerose múltipla e 3) NT idiopática, quando não há identificação de uma lesão em testes eletrofisiológicos ou ressonância magnética mostrando anormalidades significativas que possa explicar a NT (Headache Classification Committee of the IHS, 2018).

Além disso, esta condição apresenta grande influência na qualidade de vida do paciente devido à intensidade e persistência da dor. A dor da NT é relatada pelos pacientes como episódios recorrentes de dor intensa e aguda em um lado do rosto, que pode durar apenas por um curto período de tempo, muitas vezes ao dia. Esses episódios de dor podem ocorrer espontaneamente ou serem desencadeados por estímulos cotidianos inofensivos, como falar, comer, lavar o rosto, pentear o cabelo, escovar os dentes, fazer a barba ou mesmo uma brisa suave (Giorgio et al., 2021). Além disso, os pacientes enfrentam outras dificuldades como atrasos no diagnóstico, medo do surgimento repentino da dor ao longo do dia e efeitos colaterais do tratamento desta condição. Infelizmente, esses fatores contribuem para um sofrimento psicológico, que em casos extremos, podem levar a pensamentos suicidas (Araya et al., 2020; Giorgio et al., 2021). A incidência de NT é de 4 a 5 casos a cada 100.000 pessoas por ano e aumenta com a idade. Geralmente, a NT ocorre em pessoas de meia-idade e idosos, sendo mais prevalente em mulheres (Khalid, 2015; Ni et al., 2020).

Encontrar um alívio duradouro para essa dor excruciante tem sido um desafio para os pacientes e profissionais da saúde. Na década de 1940, surgiram abordagens farmacológicas

e cirúrgicas para o tratamento da NT, com a introdução de alguns medicamentos, incluindo anticonvulsantes (Prasad & Galetta, 2009).

Antes desse período, os tratamentos mais efetivos envolviam a destruição do ramo nervoso afetado por meio da aplicação de substâncias corrosivas ou pela secção da raiz sensorial do trigêmeo (Eboli et al., 2009). Em 1942, o fármaco anticonvulsivante fenitoína foi introduzido como a primeira opção de tratamento para a NT, que ainda pode ser usada em alguns casos como uma alternativa quando a carbamazepina não é bem tolerada ou ineficaz (Bergouignan, 1958). Posteriormente, foi descoberta a carbamazepina, sintetizada pela primeira vez em 1952, e utilizada pela primeira vez no tratamento da neuralgia trigeminal na década de 1960 (Spiller, 2001).

A carbamazepina é o tratamento de primeira linha na NT, mas alguns estudos evidenciam falta de responsividade dos pacientes a este tratamento, inefetividade, além do fato de que a grande maioria dos pacientes experienciam pelo menos um efeito colateral (Bendtsen et al., 2020; Maarbjerg et al., 2017). Alguns efeitos incluem sonolência, tontura, erupção cutânea, tremor, dor de cabeça, hepatotoxicidade, sintomas dermatológicos graves e às vezes fatais (Debnath et al., 2020; Hossain et al., 2020; Maarbjerg et al., 2017; Nisbet & Sehgal, 2019).

Essa droga atua principalmente inibindo os canais voltagem dependentes de sódio (Nav) do sistema nervoso, desempenhando um papel crucial na redução da excitabilidade neuronal e no controle da dor (Schwarz et al., 2021), já que na dor crônica o aumento dos Nav contribui para a hiperexcitabilidade e transmissão ectópica (Montero & Carnerero, 2018).

Uma consideração relevante sobre a carbamazepina e seus metabólitos é a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica (BH) para exercer seus efeitos centrais, conforme demonstrado por estudos recentes (Alelwani et al., 2020; Schwarz et al., 2021). Essa substância apresenta potencial de toxicidade na BH devido a um mecanismo de perturbação bioenergética. Esse efeito tóxico ocorre por meio do esgotamento dos níveis de trifosfato de adenosina (ATP), resultando em consequências nos transportadores de ATP da BH, que são essenciais para a integridade do sistema nervoso central (SNC) (Alelwani et al., 2020). Adicionalmente, foi recentemente evidenciada a citotoxicidade da carbamazepina em células endoteliais da BH (Elmorsy, 2020). Esses achados sugerem que a carbamazepina pode ter

efeitos negativos sobre as células que compõem a barreira hematoencefálica, potencialmente comprometendo sua função protetora.

Considerando o supracitado, evidencia-se a necessidade de estudos para descobertas de novos alvos terapêuticos para a analgesia na NT (McDonough et al., 2014; Nisbet & Sehgal, 2019).

## **I-2. MODELOS ANIMAIS**

De acordo com a literatura, a NT é geralmente causada pela compressão microvascular na zona de entrada da raiz trigeminal. Com base nessa característica clínica comum, modelos animais que envolvem a compressão do nervo trigeminal têm se mostrado adequados para simular a situação clínica da NT (Luo et al., 2012). Os modelos animais continuam sendo importantes para o desenvolvimento de novos medicamentos, vacinas e procedimentos cirúrgicos mais avançados. Portanto, um modelo animal robusto deve apresentar alterações comportamentais e respostas a medicamentos paralelas às características clínicas dessa condição. Ratos e camundongos têm sido os modelos mais amplamente utilizados para estudar a dor neuropática, sendo os ratos os mais comumente usados (Gupta et al., 2022).

Existem vários modelos de neuralgia trigeminal descritos na literatura, incluindo ligadura parcial do nervo infraorbitário (Xu et al., 2008), modelo animal induzido pela injeção de veneno de cobra (Jian-Xiong et al., 2019), compressão da raiz do nervo trigeminal (Jeon et al., 2012; Luo et al., 2012), lesão por constrição crônica do nervo infraorbitário ou constrição dos ramos do nervo infraorbitário (Deseure & Hans, 2015; Ding et al., 2017; Fu et al., 2020; Hardt et al., 2019).

No modelo de lesão por constrição crônica (CCI) do nervo infraorbitário distal (IoN), devido à sua localização, não é necessária uma abordagem invasiva ao animal e o território do IoN permanece intacto (Ding et al., 2017). Além disso, o resultado comportamental dos ratos submetidos a IoN-CCI reflete de forma mais próxima a lesão do IoN. Dessa forma, o procedimento cirúrgico IoN-CCI é considerado adequado e confiável para estudar a dor neuropática trigeminal (Ding et al., 2017; Hardt et al., 2019)

### **I-3. TRANSMISSÃO DA INFORMAÇÃO DOLOROSA OROFACIAL**

Após a lesão do nervo trigeminal, ocorrem mudanças nas estruturas neuronais devido à desmielinização das fibras nervosas, o que, por sua vez, desencadeia alterações moleculares que desempenham um papel importante no desenvolvimento de sintomas na NT (Giorgio et al., 2021). A desmielinização das fibras nervosas causa uma alteração na condução dos impulsos elétricos, resultando em hiperexcitabilidade, levando a disparos ectópicos que geram os sintomas da dor (Gambeta et al., 2020). As gerações ectópicas são provocadas pelos potenciais de ação e descargas prolongadas dos neurônios, essas descargas ectópicas são amplificadas e distribuídas através de uma transmissão enfática entre fibras mielinizadas e não mielinizadas (fibras aferentes A $\beta$  e fibras C nociceptivas), contribuindo para o desenvolvimento de sintomas na neuropatia (Chen & Heinricher, 2022; Iwata et al., 2017; Rotpenpian & Yakkaphan, 2021).

Os receptores sensoriais especializados, conhecidos como nociceptores, são terminações periféricas livres associadas a dois tipos de fibras nervosas aferentes: fibras do tipo A $\delta$  e fibras do tipo C. Essas fibras desempenham um papel crucial na condução das informações dolorosas da periferia ao SNC. As fibras A $\delta$  são caracterizadas por ser mielinizadas e possuem uma velocidade de condução intermediária. Elas desempenham um papel na modulação da primeira fase da dor, que é mais aguda ou semelhante a uma pontada. Por outro lado, as fibras C são fibras não mielinizadas, possuem uma velocidade de condução lenta. Elas são responsáveis pela transmissão da segunda dor, difusa, que é descrita como uma queimação persistente (Besson, 1997; Klaumann et al., 2008) Além disso, as fibras do tipo C têm a capacidade de reagir a uma ampla gama de estímulos, incluindo estímulos térmicos e mecânicos de alta intensidade, bem como estímulos químicos. Por essa razão, elas são denominadas nociceptores polimodais (Iwata et al., 2017).

As informações sensoriais orofaciais são transmitidas ao SNC pelo nervo trigêmeo (Fig. 1). Essas informações, em última instância, atingem o tálamo, a partir de onde os estímulos serão projetados para o córtex, mas também chegam à formação reticular. O sistema trigeminal é composto por quatro núcleos localizados no tronco encefálico, cada um desempenhando funções especializadas. O núcleo mesencéfálico é responsável pela propriocepção da musculatura mastigatória, da articulação temporomandibular (ATM) e do periodonto. O núcleo principal processa informações táteis da pele e mucosa da face. O

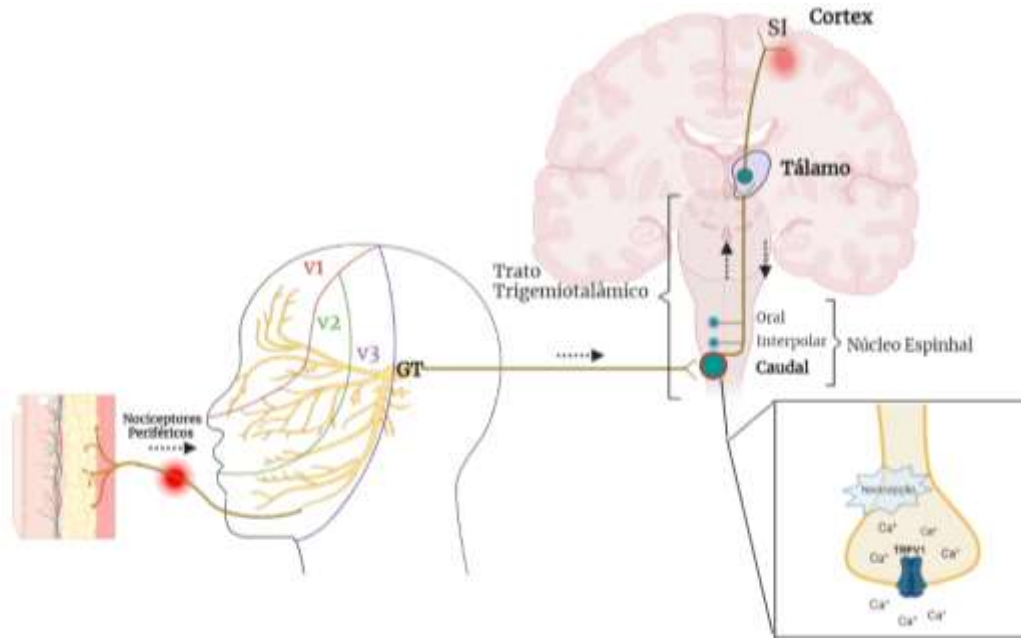


núcleo motor está envolvido em reflexos monossinápticos. Por fim, o núcleo espinal é responsável pelo processamento de informações de dor e temperatura (Kawamura, 1971). O núcleo espinal é dividido em três subnúcleos: oral, interpolar e caudal, localizados no tronco encefálico. Especificamente, o subnúcleo caudal (Vc), desempenha um papel importante no processamento de informações nociceptivas provenientes da face (Akhter et al., 2014). Portanto, os sinais nociceptivos da região orofacial são transmitidos centralmente por meio das fibras aferentes do gânglio trigeminal até o subnúcleo caudal (Vc), onde ocorre a sinapse com neurônios de segunda ordem que se projetam para os córtices somatossensorial e límbico através do tálamo.

A percepção da dor é um fenômeno dinâmico que ocorre após a informação nociceptiva proveniente da periferia ser modulada em vários níveis do SNC, o que pode inibir ou facilitar a transmissão sensorial (Bista & Imlach, 2019; Jessri et al., 2020). De fato, a modulação da transmissão nociceptiva desempenha um papel crucial na instalação de dor crônica. Neste sentido, a estimulação repetida ou prolongada do nervo trigeminal pode levar a alterações no sistema nervoso central e periférico, resultando em uma resposta amplificada à dor. Isso pode se manifestar como uma sensibilidade aumentada a estímulos normalmente não dolorosos (alodinia) ou uma resposta exagerada a estímulos dolorosos (hiperalgesia) (Bista & Imlach, 2019; Iwata et al., 2017; Korczeniewska et al., 2020). Estas são respostas de sensibilização mediadas por diversos fatores pró-inflamatórios, fatores neurotróficos e neuropeptídeos presentes nas terminações periféricas, assim como pela expressão diferencial de canais iônicos, comunicação entre fibras nervosas lesadas e intactas, e aumento da liberação de neurotransmissores nos terminais centrais (Bista & Imlach, 2019; Korczeniewska et al., 2020).

Diversas evidências clínicas e experimentais indicam também o sistema endocanabinoide na modulação da dor (Finn et al., 2021; Walker & Huang, 2002; Zogopoulos et al., 2013). O sistema endocanabinoide consiste, majoritariamente, em receptores canabinoides endógenos presentes no sistema nervoso, bem como endocannabinoides, que são os ligantes naturais desses receptores. Após uma lesão nervosa, ocorre um aumento nos níveis de endocannabinoides periféricamente e centralmente (Crescente et al., 2022)

**Figura 1** - Vias relacionadas a transmissão da dor na neuralgia trigeminal.



**Fig. 1:** Na área da face, os nociceptores periféricos são terminações nervosas das fibras aferentes sensoriais do nervo trigêmeo. Essas fibras nervosas sensoriais mielinizadas (A $\delta$ ) e não mielinizadas (C) tem seus corpos celulares localizados no gânglio trigeminal e sua entrada no SNC ocorre pelo subnúcleo caudal (Vc) do núcleo espinal do trigêmeo do tronco encefálico. Em seguida, os neurônios de segunda ordem transmitem a informação para o tálamo através do trato trigeminotalâmico conectando-se com o sistema límbico até atingir o córtex somatossensorial. Os neurônios da terceira ordem modulam essa informação da dor na via ascendente e descendente. Os estímulos da via descendente surgem do córtex somatossensorial primário (SI), para o córtex somatossensorial (SII) secundário e Medula Rostral Ventromedial (RVM), até o Vc novamente. **Fonte própria.**

#### I-4. CANABINOIDES E ANALGESIA

Na década de 1990, pesquisadores descobriram o Sistema Endocanabinoide (ECS) como um sistema regulador homeostático que controla muitos processos fisiológicos no sistema nervoso (Mallick-Searle & Marie, 2019). Nossa compreensão da amplitude e profundidade do sistema endocanabinoide está em contínua expansão, no entanto, em sua essência, pode ser definida por três componentes principais: os ligantes endógenos (endocanabinoides), os receptores para esses ligantes (receptores canabinoides) e as enzimas responsáveis pela síntese e degradação desses ligantes (Cristino et al., 2020). Os ligantes mais estudados conhecidos como endocanabinoides incluem a anandamida (AEA)

e o 2-araquidonilglicerol (2-AG). A síntese desses endocanabinoides é mediada pelas proteínas N-acil-fosfatidiletanolamina específica fosfolipase D (NAPE-PLD) e diacilglicerol lipase (DAGL), enquanto sua degradação é realizada pelas enzimas hidrolase de amidas de ácidos graxos (FAAH) e Monoacilglicerol lipase (MGL), respectivamente (Piomelli, 2005). Os diversos efeitos farmacológicos do CBD estão associados à sua interação com vários receptores no sistema nervoso central e periférico. Estes receptores incluem os canabinoides do tipo 1 (CB1) e tipo 2 (CB2), PPAR $\gamma$ , TRPV1, 5-HT1A, GPR55, entre outros (Campos & Guimarães, 2009; Sonogo et al., 2018; Vučković et al., 2018).

Ao longo das últimas décadas, tem havido um crescente interesse em pesquisas sobre o uso da planta *Cannabis sativa* para o tratamento de diversas doenças e condições, incluindo a dor crônica (Agarwal et al., 2007; Silva et al., 2017; Zogopoulos et al., 2013). Existem mais de 100 fitocanabinoides isolados derivados dessa planta, dentre eles, os mais explorados em extensas pesquisas médicas para seu uso farmacológico são o Delta-9-tetrahydrocannabinol (THC), considerado o componente principal que apresenta propriedades psicoativas, e o Canabidiol (CBD), o análogo não psicomimético do THC (Vučković et al., 2018). Uma vez que o CBD não apresenta os efeitos psicomimético do THC e possui diversas aplicações terapêuticas tais como capacidade antioxidante, anti-inflamatória, antidepressiva, ansiolítica, neuroprotetora, analgésica (antinociceptiva), entre outros (Fiani et al., 2020), tem se tornado uma droga promissora para seu uso na dor crônica neuropática orofacial (Urits et al., 2020).

Efeitos antinociceptivos de agonistas mistos de receptores CB1/CB2, agonistas seletivos de receptores CB1 e agonistas seletivos de receptores CB2 suprimem o comportamento nociceptivo aumentado nos modelos de CCI, ligadura do nervo espinal (SNL) e ligadura parcial do nervo ciático (Adamson Barnes et al., 2016; Rahn & Hohmann, 2009). Além disso, a amida de ácido graxo N-Palmitoiletanolamida (PEA), um substrato de FAAH e um ligante endógeno de PPAR- $\alpha$ , produz efeitos antinociceptivos em um modelo de SNL em ratos e em um modelo de CCI em camundongos (Costa et al., 2008; Di Cesare Mannelli et al., 2013). Vale ressaltar que os inibidores da FAAH produzem efeitos antinociceptivos no modelo de CCI, sem o desenvolvimento de tolerância após administração repetida (Schlosburg et al., 2010).

Na região orofacial, assim como em outras regiões do corpo, foi observado que os receptores canabinoides são modulados em condições de dor inflamatória e neuropática. Em um modelo de dor orofacial induzida por neuropatia provocada por compressão do nervo infraorbitário em ratos, a expressão dos receptores CB1 a nível proteico aumentou nas lâminas superficiais do subnúcleo caudal espinal do trigêmeo (Liang et al., 2007). Em seres humanos, a expressão dos receptores CB1 e CB2 a nível de RNA mensageiro e proteico foi aumentada nos tecidos gengivais em condições inflamatórias (como em casos de gengivite e periodontite) (Nakajima et al., 2006).

Embora o CBD apresente um grande potencial terapêutico como agente anti-inflamatório, antioxidante e antinociceptivo, e seja caracterizado por uma baixa propensão para induzir efeitos adversos significativos, como mencionado anteriormente, uma limitação para seu uso clínico é a baixa e variável biodisponibilidade oral em humanos (Agurell et al., 1981). Além dessa limitação, o CBD demonstra um efeito em forma de curva de U invertido (ou aspecto de sino), onde em estudos com animais, sua faixa de dose efetiva é limitada (Zuardi et al., 2017). Portanto, uma abordagem alternativa para o desenvolvimento de novas opções terapêuticas seria a criação de novos compostos que apresentem perfil clínico e segurança semelhantes ao CBD, mas com biodisponibilidade e potência clínica aprimoradas (Campos et al., 2012).

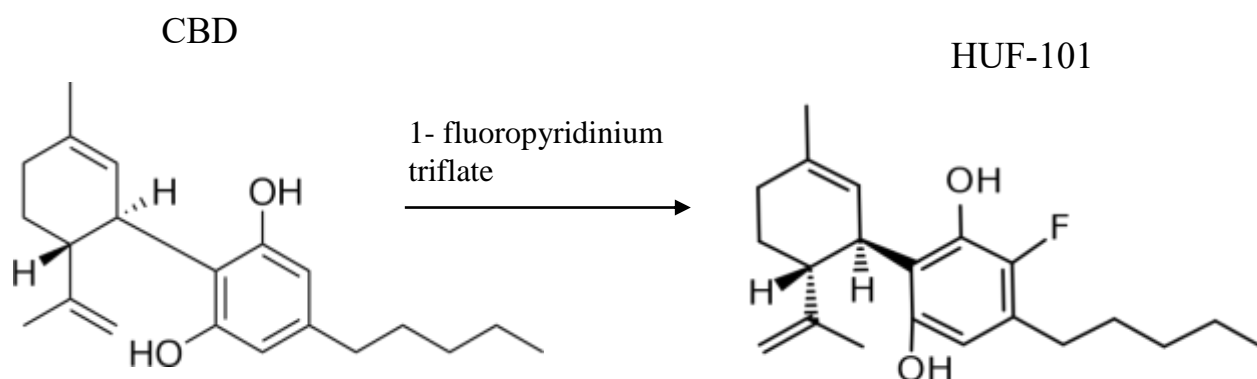
Os fitocannabinoides, como o CBD, são lipofílicos, o que possibilita a realização de sínteses em diferentes posições. As modificações estruturais do CBD podem incluir a introdução de substituintes halogenados no anel fenólico. A síntese farmacológica de três novos derivados fluorados halogenados do CBD foram relatados (HUF-101, HUF-102, HUF-103) (Morales et al., 2017). Dentre estes, o PECS-101 (antigo HUF-101) demonstrou melhores resultados em ensaios experimentais relacionado a ansiedade, depressão, psicose, transtorno compulsivo (Morales et al., 2017). A síntese do PECS-101 consiste na adição de uma molécula de flúor no anel aromático resultando em um composto sintético derivado do CBD (Breuer et al., 2016). Esse composto foi sintetizado pelo Prof. Dr. Raphael Mechoulam, da Universidade Hebraica de Jerusalém.

Entre os efeitos possíveis relacionados à estratégia de adição de átomos de flúor em moléculas, destaca-se o aumento da estabilidade metabólica. Isso é um fator crucial na biodisponibilidade de um composto, uma vez que a rápida metabolização oxidativa pelas

enzimas do citocromo P450 pode limitá-la. Adicionalmente, a presença de flúor pode modificar o caráter básico de um composto, reduzindo uma característica que dificulta sua permeabilidade nas membranas celulares. Por fim, o flúor pode também aumentar a afinidade do composto pelos seus sítios de ligação (Park et al., 2001).

Estudos recentes indicam um efeito antinociceptivo do PECS-101 em doses mais baixas quando comparado com o CBD. Essas drogas foram testadas em camundongos suíços machos submetidos aos seguintes modelos preditivos para medicamentos antinociceptivos: placa quente, contorções induzidas por ácido acético e hiperalgisia inflamatória induzida por carragenina (Silva et al., 2017). A melhora no perfil farmacológico com a adição de flúor na molécula de CBD também foi evidenciada em modelo de dor neuropática induzida por quimioterápicos (Silva et al., 2022).

**Fig. 2** – Fórmula estrutural do CBD e PECS-101 (HUF-101).



### I-5. O RECEPTOR DE POTENCIAL TRANSIENTE VANILÓIDE 1 (TRPV1)

Acredita-se que os principais efeitos farmacológicos do THC sejam mediados pela ativação dos receptores canabinoides 1 e 2 (CB1 e CB2). No entanto, o CBD tem pouca ou nenhuma afinidade de ligação com os receptores CB1 e CB2 (Navarro et al., 2018). Em conformidade, o CBD exerce suas propriedades anti-inflamatórias através da regulação dos canais do potencial transitório dos receptores (TRP), como o receptor vanilóide do potencial transitório (TRPV) tipo 1 e tipo 2 (Costa et al., 2004).

Os canais TRP (do inglês "Transient Receptor Potential") são uma super família de canais iônicos transmembranares envolvidos na transdução de respostas a uma ampla

variedade de estímulos físicos e químicos. Os canais TRP são classificados em nove subfamílias e contam com mais de 30 membros, tornando-os a segunda maior classe de canais iônicos. Eles atuam como canais catiônicos não seletivos permeáveis ao  $Ca^{2+}$ . O cálcio intracelular, como o mensageiro secundário mais abundante, desempenha um papel importante na fisiologia celular fundamental, incluindo controle do ciclo celular, autofagia e apoptose, expressão gênica e motilidade celular (Luo et al., 2012). Esses receptores são subdivididos em seis subfamílias, incluindo TRPC (Canônica), TRPV (Vaniloide), TRPM (Melastina), TRPP (Poliquistina), TRPML (Mucolipina) e TRPA (Anquirina). A subfamília TRPV contém seis membros: TRPV1/TRPV2, TRPV3, TRPV4 e TRPV5/TRPV6, recebendo esse nome em referência ao seu membro fundador, o receptor vaniloide (Capsaicina), VR1, que foi clonado em 1997, sendo também o membro mais estudado dessa subfamília (Abbas, 2020; Caterina et al., 1997; Louis-Gray et al., 2022) adicionalmente, evidências tem reforçado a importância desse receptor na transmissão da dor (Abbas, 2020).

Os canais TRPV1 são expressos nos gânglios sensoriais (GT, DRG, vagal), neurônios sensoriais periféricos (Fibras C e A $\delta$ ), nos terminais de neurônios sensoriais centrais, onde os aferentes periféricos formam sinapses com aferentes do nervo trigêmeo no subnúcleo caudal do núcleo espinal do trigêmeo e no corno dorsal da medula espinhal, assim como também são encontrados em alguns tecidos não neuronais (Jara-Oseguera et al., 2008; Louis-Gray et al., 2022). Interessantemente, recentemente foi evidenciado que neurônios que expressam TRPV1 estão envolvidos na sensibilidade à dor induzida por carragenina em articulação temporomandibular em ratos machos e fêmeas (Leite-Panissi et al., 2023).

O TRPV1 é uma proteína de canal iônico pró-nociceptiva ativada pela capsaicina, calor e múltiplos ligantes endógenos como anandamida (Ross, 2003). Curiosamente, a administração de capsaicina não apenas produz uma sensação transitória de dor ardente, mas também induz analgesia através da dessensibilização do receptor para condições de dor neuropática (Vyklícký et al., 2008; Wang et al., 2020). Assim, a dessensibilização do receptor pode tornar o canal TRPV1 não funcional para estímulos dolorosos subsequentes (Novakova-Tousova et al., 2007) e, finalmente, induzir uma analgesia paradoxal. Esse fenômeno, chamado de dessensibilização imediata, tem sido relatado para a maioria dos canais TRP, incluindo os canais TRPV1-4 e TRPA1 (Akopian et al., 2009). Entre os agonistas exógenos do TRPV1 além da capsaicina, podem ser: outros

vaniloides Resiniferatoxina (RTX), flavonoides, alcaloides, terpenoides e canabinoides (Abbas, 2020).

Considerando isso, o uso de canabinoides tem sido apontado como uma opção terapêutica através desses mecanismos (Louis-Gray et al., 2022). Portanto, pelo menos em parte, as ações anti-nociceptivas e anti-hiperalgênicas do CBD parecem ser mediadas pela ativação, desfosforização e forte dessensibilização dos canais TRPV1 (Silvestro et al., 2020).

De fato, estudos recentes indicam que TRPV1 pode ser dessensibilizado por CBD, um dos mecanismos que explica seu efeito analgésico em neuropatias (Crescente et al., 2022; Jara-Oseguera et al., 2008; Luo et al., 2019).

## **I-6. HIPÓTESE**

Dada a necessidade de buscar novos alvos terapêuticos e alternativas para o tratamento da neuralgia trigeminal, hipotetizamos neste estudo que os compostos canabinoides CBD, PECS-101e a combinação de CBD com Capsazepina (antagonista de TRPV1) possam ter efeitos antinociceptivos na neuralgia induzida pela constrição do nervo infraorbitário em ratos. Além disso, nossa hipótese sugere que esses efeitos possam ser semelhantes ou até mais positivos em comparação com o efeito da Carbamazepina, uma droga clássica utilizada para tratar essa condição.

## **II. OBJETIVOS**

---



## **II-1. OBJETIVOS GERAIS**

O objetivo geral deste estudo foi investigar o potencial terapêutico de dois compostos canabinoides, o CBD (canabidiol) e o PECS-101 (canabinoide sintético), sobre a nocicepção induzida pela constrição do nervo infraorbitário, um modelo animal clássico da neuralgia trigeminal. Além disso, o estudo teve como objetivo comparar a resposta antinociceptiva desses compostos com a Carbamazepina, que é a droga padrão para essa condição. Também foi analisada a influência desses compostos no receptor TRPV1 por meio da quantificação de sua expressão proteica no subnúcleo caudal do núcleo espinal do trigêmeo e por meio de estratégia farmacológica com antagonista de TRPV1.

## **II-2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

**II-2.1.** O primeiro objetivo deste estudo foi avaliar o efeito antinociceptivo do CBD e PECS-101 na NT nas seguintes doses: 3, 10, 30 mg/kg, pelos testes nociceptivos de Von Frey e Formalina orofaciais. A Carbamazepina (nas mesmas doses) também foi testada pelos mesmos testes.

**II-2.2.** Na segunda etapa da dissertação, o objetivo foi investigar a quantificação de proteínas do receptor TRPV1 no subnúcleo caudal do núcleo espinal do trigêmeo, pela técnica de Western Blotting, para avaliação de possíveis mecanismos de ação dos canabinoides (CBD e HUF-101).

**II-2.3.** Considerando os resultados do objetivo #2, tivemos como terceiro objetivo confirmar o envolvimento do receptor TRPV1 por estratégia farmacológica, mediante a co-administração de um antagonista deste receptor, CPZ (5 mg/kg), e as doses sub-efetivas do CBD (3 /10 mg/kg). O efeito desta associação foi avaliada pelos testes nociceptivos de Von Frey e Formalina orofaciais e avaliação da coordenação motora por Rota-Rod.

**II-2.4.** Com base nos efeitos colaterais induzidos pelo tratamento crônico com Carbamazepina já descritos na literatura, buscamos aqui avaliar o desempenho motor dos animais submetidos à IoN-CCI e tratados com as drogas avaliadas neste estudo pelo teste de avaliação da coordenação motora por Rota-Rod.

### **III. MATERIAL E MÉTODOS**

---

### III.1 MATERIAIS UTILIZADOS

#### III.1.1. CONSUMÍVEIS

**Tabela 1-** Lista de materiais necessários para realização dos experimentos.

<b>Materiais</b>	<b>Fabricante</b>
Agulha descartável 30G BD	BD PrecisionGlide
Agulha descartável 45G BD	BD PrecisionGlide
Seringa descartável BD	Plastipak
Luvas	Supermax
Fio de sutura 4-0 seda	Ethicon
Gaze	3M
Pipeta	Pasteur RBR
Placa 6 poços	Costar
Ponteiras 10ul, 200ul, 1000ul, 5ml e 10ml	Axygen
Tubo eppendorf 200ul, 2ml, 5 e 10ml	Eppendorf
Tubo Falcon 15ml e 50ml	Greiner
Formalina	Sigma Aldrich

**Fonte:** Elaborado pelo próprio autor

#### III.1.2 REAGENTES UTILIZADOS PARA DILUIÇÃO DE DROGAS

**Tabela 2-** Lista de reagentes necessários para o preparo e diluição de drogas (veículos) utilizadas no tratamento dos animais e realização dos estudos comportamentais.

<b>Reagentes</b>	<b>Fabricante</b>	<b>N° de catálogo</b>	<b>Fórmula química</b>
Dimetilsulfóxido (DMSO)	LabSynth	67-68-5	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> SO
Tween 80	LabSynth	-	C <sub>64</sub> H <sub>124</sub> O <sub>26</sub>

### III.1.3 APARELHOS

**Tabela 3-** Lista de instrumentos utilizados no decorrer dos experimentos.

<b>Material</b>	<b>Modelo</b>	<b>Fabricante</b>
Analgesímetro Digital	Wi-fi	Insight
Agitador magnético	752	Fisatom
Agitador multifuncional	TS-2000A	Biomixer
Agitador Vórtex	Ap59	Phoenix Lufenco
Balança de precisão	ATY224	Shimadzu
Capela de exaustão	Q216-23	Quimis
Centrífuga	5403	Eppendorf
Cronômetro	-	Abcam
Espectrofotômetro	-	Biotek
Fonte para eletroforese	-	Loccus biotecnologia
Homogenizador mecânico	PT 1200 E	Kinemática AG
Medidor de pH (PHmetro)	SC06	Ms Tcnopon Instrumentação
Orbital Shaker	Gyromax <sup>tm</sup> 737R	Amerex Instruments, Inc.
Thermomix R	-	Eppendorf
Sistema de transferência turbo	-	System Bio-Rad
Trans-blot		
Imager Blot 680	Amersham	GE (Healthcare)
Rota Rod	-	Ugo Basile
Computador	Z440	HP

**Fonte:** Elaborado pelo próprio autor

### III.1.4 MATERIAIS UTILIZADOS PARA REALIZAÇÃO DA TÉCNICA DE WESTERN BLOTTING

#### III.1.4.1 REAGENTES

**Tabela 4-** Lista de reagentes necessários para realização de Western Blotting.

Reagentes	Fabricante	Nº de catálogo	Fórmula química
<sup>2x</sup> Laemmli Sample Buffer	Bio-Rad	161-0737	-
β-Mercapto-etanol	Millipore	-	HSCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH
Ácido acético	LabSynth	-	
Álcool etílico absoluto (100%)	LabSynth	-	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH
Azul brilhante de Coomassie	SIGMA	-	C <sub>47</sub> H <sub>48</sub> N <sub>3</sub> NaO <sub>7</sub> S <sub>2</sub>
Bisacrilamida 30%	SIGMA	SLCB1321	-
Bradford	Bio-Rad	SLCK1933	-
Hipoclorito de sódio (HCL)	LabSynth	-	NaClO
Inibidor de protease e fosfatase	ThermoFisher scientific	PPC1010	-
Marcador de peso molecular	CellStar®	26634	-
Reagente de extração de proteína de mamíferos (MPER®)	ThermoFisher scientific	78501	-
Tween 20	LabSynth	-	C <sub>58</sub> H <sub>114</sub> O <sub>26</sub>
Tetrametiletenodiamina (TEMED)	ThermoFisher Scientif	15524010	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> )

**Fonte:** Elaborado pelo próprio autor.

### III.1.4.2 SUBSTÂNCIAS

**Tabela 5-** Lista de substâncias necessárias para realização de Western Blotting.

<b>Substâncias</b>	<b>Fabricante</b>	<b>N° de catálogo</b>	<b>Fórmula química</b>
Albumina de soro bovino (BSA)	Sigma	9048-46-8	-
Cloreto de sódio	Sigma	31434	NaCl
Dodecilsulfato de sódio (SDS)	Sigma	151-21-3	C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> O <sub>4</sub> S
Glicina	Sigma	G8898	C <sub>2</sub> HNO <sub>2</sub>
Leite em pó desnatado	La sereníssima	-	-
Peroxodissulfato de amônia (APS)	Merck	7727-54-0	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>
Ponceua (s)	Sigma	P3504	C <sub>22</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O
Tris (hidroximetil) aminometano	Merck	77-86-1	H <sub>2</sub> NC(CH <sub>2</sub> OH) <sub>3</sub>

### III.1.4.3 MATERIAIS

**Tabela 6-** Lista de materiais utilizados para realização do Western Blotting.

<b>Material</b>	<b>Fabricante</b>
Cuba de eletroforese	Bio-Rad (Mini-PROTEAN Tetra System)
Cubas de vidro	-
Membrana de nitrocelulose (0,2um 30cmx 3.5m)	Bio-Rad
Papel de filtro	Bio-Rad mini trans-blot ®
Placas de vidro 1,5mm	Mini proteans ® System Bio-Rad
Pentes 1,5mm	Mini proteans ® System Bio-RAD
Suporte de placa	Bio-Rad
Anticorpo TRPV1	Novus Biologicals

Anticorpo HRP

Sigma Aldrich

**III.1.4.4 TAMPÕES PREPARADOS****Tabela 7-** Lista de tampões e soluções utilizados para realização de Western Blotting.

<b>Solução</b>	<b>pH</b>	<b>Reagentes</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Água destilada(ml)</b>
Tampão de corrida (10x)	-	Tris-base	30g	1000
		Glicina	144g	
		SDS	4g	
Tampão de corrida (1x)	-	Tampão de corrida (10x)	-	900
		Tris-base	15g	1000
Tampão de transferência (5x)	-	Glicina	72g	
		SDS 10%	5g	
Tampão de transferência (1x)	-	Tampão de transferência 5x	40ml	120
		Álcool etílico	40ml	
TBS (10x)	7,6	Tris-base	24g	1000
		Cloreto de sódio	88g	
TBS-t com Tween 20 (0,05%)	-	TBS (10x)	100ml	900
		Tween 20	5ml	1000
Ponceua (s)	-	Ponceau(s) em pó	0,1g	1000
		Ácido acético	5ml	
NaOH	-	NaOH	500ul	50
Tampão para bloqueio	-	TBS-t	50ml	-
		Leite em pó desnatado	5%	
1,5 M Tris-Base	8,8	Tris-base	90,86g	50ml
0,5M Tris-Base	6,8	Tris-base	30,25	500ml

### III-1.4.5. DROGAS

**Tabela 8** – Lista de drogas e concentrações utilizadas no experimento.

<b>Droga</b>	<b>Empresa</b>	<b>Dose/Concentração</b>	<b>Vias de administração</b>
Canabidiol (CBD)	BSPG Laboratories, Reino Unido	3mg/kg 10mg/kg 30mg/kg	Intraperitoneal (i.p.)
PECS-101 (HUF- 101)	Gentilmente cedido pelo Rafael Mechoulam	3mg/kg 10mg/kg 30mg/kg	Intraperitoneal (i.p.)
Carbamazepina (CBZ)	Carbamazepine- 10,11-epoxide- 13C6 SIGMA	3mg/kg 10mg/kg 30mg/kg	Intraperitoneal (i.p.)
Capsazepina (CPZ)	Capsazepine Catalog Number: 0464 TOCRIS	5mg/kg	Intraperitoneal (i.p.)

**Fonte:** Editado pelo próprio autor

## III-2. MÉTODOS

### III-2.1. ANIMAIS

Para realização deste estudo, foram utilizados ratos Wistar machos (peso corporal de 150-200g, Biotério Central da USP - Campus de Ribeirão Preto, (Total = 217) foram alojados e mantidos em grupos de três por gaiola em um ambiente controlado, sob um ciclo claro-escuro de 12 horas (acendimento das luzes às 06:00 e desligamento às 18:00), em uma sala silenciosa com temperatura controlada ( $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), com alimentação e água ad libitum. Todos os procedimentos experimentais com animais foram aprovados pelo Comitê de Cuidados e Uso de Animais da Universidade de São Paulo/Brasil, no Campus de Ribeirão Preto sobre o número (2022.1.134.58.2). Os procedimentos experimentais foram submetidos



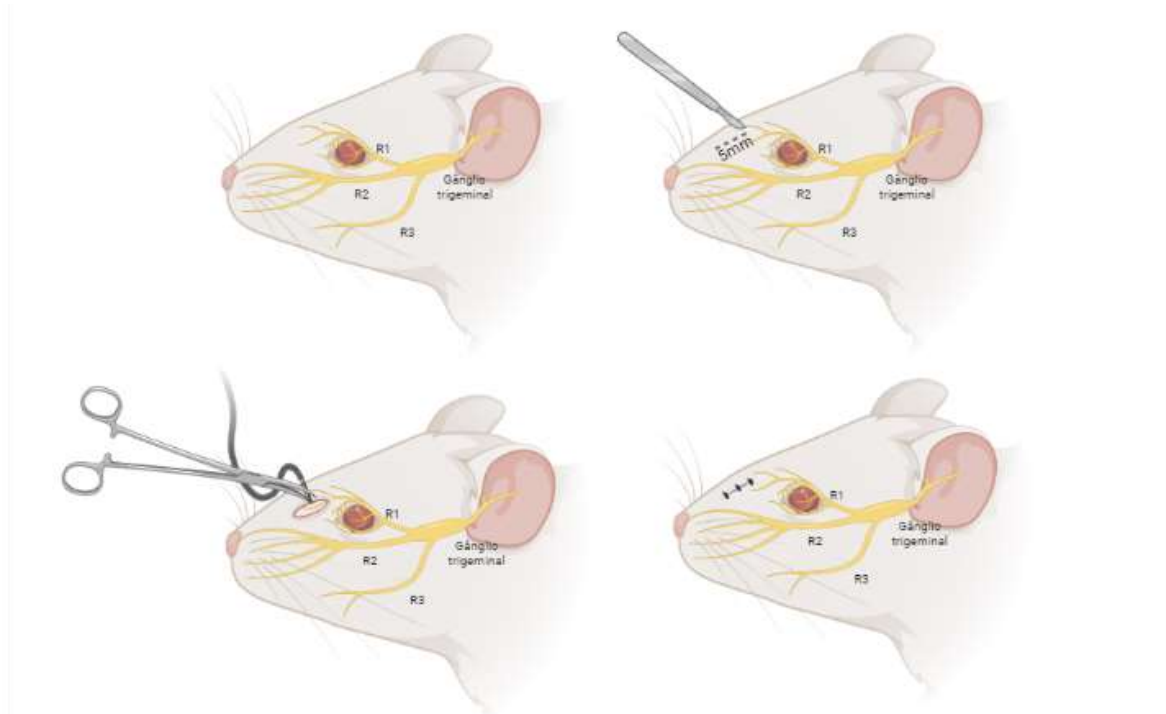
ao Comitê de Ética em Experimentação Animal e estão de acordo com as diretrizes determinadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e pela Associação Internacional para Estudo da Dor (IASP), em animais conscientes (Zimmermann, 1983). Todos os esforços foram feitos para minimizar o número de animais utilizados neste estudo.

### **III-2.2. MODELO DE NEURALGIA**

#### **III-2.2.1. Lesão por Constrição Crônica do Nervo Infraorbitário (IoN-CCI):**

O modelo utilizado para indução da neuralgia trigeminal neste estudo foi o IoN-CCI (Fig. 3), por constrição crônica do nervo infraorbitário distal fora da cavidade orbital por meio de uma incisão facial (dIoN-CCI), sendo a cirurgia realizada no lado direito. O grupo Sham foi submetido ao mesmo procedimento, porém sem a realização da constrição do nervo (Sham-operados). Todas as intervenções cirúrgicas foram realizadas em ratos sobre anestesia com cetamina 10% (75 mg/kg) e xilazina 4% (5 mg/kg) por meio de injeção intraperitoneal. Para manter a assepsia, a pele da face dos animais foi cuidadosamente raspada, sem prejudicar as vibrissas, e em seguida, foi feita a lavagem com iodo, seguida pela remoção do excesso de iodo com álcool isopropílico a 70%. Em seguida, foi feita uma incisão acima do lábio superior direito lateral ao nariz expondo o nervo infraorbitário (Trevisan et al., 2016; Vos et al., 1994). A fáscia superficial foi delicadamente separada e o nervo infraorbitário distal direito foi exposto. Utilizaram-se dois ligamentos de seda (4-0) para ligar o nervo nas extremidades proximal e distal, com um intervalo de aproximadamente 2 mm. A constrição do nervo consistiu em reduzir o diâmetro do nervo, sem bloquear a condução nervosa, e garantindo que a circulação sanguínea do nervo não fosse obstruída para evitar a necrose. Após a cirurgia, a incisão cutânea foi fechada (Ding et al., 2017).

**Fig. 3** – Ilustração representativa da cirurgia para constrição do nervo infraorbitário (IoN-CCI).



**Fig. 3:** Ilustração do procedimento cirúrgico para indução da neuralgia trigeminal por constrição do nervo infraorbitário em ratos. Inicialmente, raspamos a superfície facial entre o olho e as vibrissas do rato e realizamos a assepsia adequada da região. Em seguida, fizemos uma incisão acima do lábio superior direito, lateral ao nariz, expondo o nervo infraorbitário. Para promover a indução da neuralgia, amarramos frouxamente duas ligaduras crônicas (4-0) ao redor da parte distal do nervo infraorbitário, mantendo uma distância de 2 mm entre elas. Após o procedimento, fechamos a incisão na pele com sutura de poliéster (4-0). **Fonte:** Criado pelo próprio autor usando o software Biorender.

### III-2.3. TESTES NOCICEPTIVOS OROFACIAIS

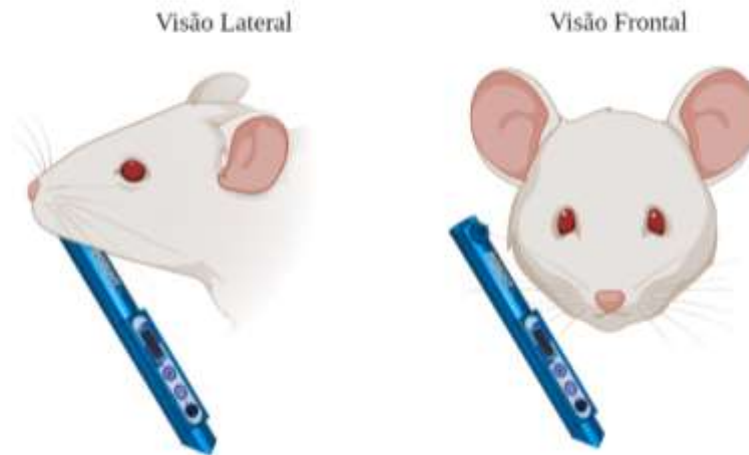
#### III-2.3.1 Avaliação do limiar mecânico para determinar alodinia (Von Frey):

As medidas de alodinia mecânica foi realizada pelo examinador que não tinha conhecimento dos tratamentos, utilizando um dispositivo digital (filamentos de von Frey, Insight Instruments, SP, Brasil) (Fig. 4) que consiste em um filamento rígido conectado a um dispositivo eletrônico que mede o limiar de resposta em gramas (g) quando o filamento é aplicado na superfície da região testada (Crivelaro do Nascimento et al., 2020; Vivanco-Estela et al., 2021).

No primeiro dia experimental, antes da indução da IoN-CCI, todos os animais foram colocados na caixa de teste por 10 minutos (período de habituação). O limiar mecânico foi

calculado como a média de três valores obtidos em cada sessão (Silva-Cardoso et al., 2021). As sessões de teste foram realizadas 7 dias antes e 21 dias após a cirurgia, e 7 dias após o tratamento (dias -7, 21, 28).

**Fig. 4** – Analgesímetro digital para modelo nociceptivo comportamental Von Frey (Insight)



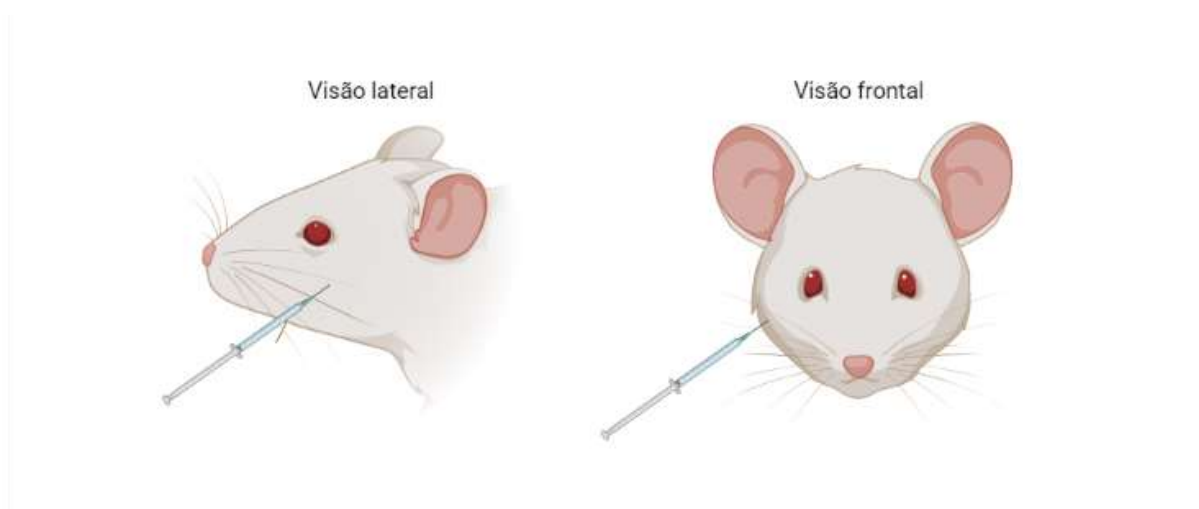
**Fig. 4:** Imagem representativa usando o Analgesímetro Digital para von Frey Orofacial, equipado com um visor digital que exibe a força em gramas. Essa medida é utilizada para avaliar o limiar de nocicepção do animal, permitindo uma medição precisa da sensibilidade à dor. **Fonte:** Criada pelo autor, utilizando o software Biorender

### III-2.3.2 Avaliação do limiar mecânico para determinar hiperalgesia (Formalina):

O teste da formalina foi realizado como modelo de dor orofacial (Fig. 5), conforme descrito por (Clavelou et al., 1995). Para a administração das soluções de formalina, os ratos foram adaptados a uma câmara de teste por 20 minutos. A sala experimental possuía uma temperatura controlada de  $25 \pm 1$  °C e não tinha atividade humana, sons e odores. Os animais não tiveram acesso a água e comida. O teste consiste em uma injeção subcutânea de uma solução diluída de formaldeído (0,05 ml, 5%) em solução salina a 0,9%, realizada o mais rapidamente possível (para evitar manipulação prolongada), com um volume de 50  $\mu$ L no lábio superior, lateral ao nariz dos ratos (área dos vibrissas), no lado da lesão. Uma agulha 30G 1/2" acoplada a uma seringa plástica de 1 mL foi utilizada para as injeções. Cada rato foi então colocado de volta na câmara e o período de observação de 45 minutos foi iniciado. A resposta comportamental relacionada à intensidade da dor foi o ato de friccionar a zona

injetada. A resposta de fricção foi analisada em duas fases, fase 1 (0-15 minutos) e fase 2 (15-45 minutos). A fase 1, conhecida como inicial ou neurogênica, ocorre nos primeiros minutos após a injeção de formalina. É caracterizada por uma resposta rápida e intensa, que está principalmente associada à ativação direta dos canais TRPA1 (Potencial Transiente do Receptor Anquirina 1) e TRPV1 (Potencial Transiente do Receptor Vanilóide 1), ambos envolvidos na percepção da dor. A segunda fase, fase tardia ou inflamatória ocorre aproximadamente de 15 a 45 minutos após a injeção de formalina. Ela é caracterizada por uma resposta mais prolongada e contínua, incluindo e está associada à liberação de mediadores inflamatórios, como prostaglandinas, bradicinina e citocinas, que sensibilizam e ativam as fibras nervosas responsáveis pela detecção de dor (nociceptores) na área afetada (Dubuisson & Dennis, 1977; Tjølsen et al., 1992).

**Fig. 5** - Modelo nociceptivo comportamental: Formalina orofacial



**Fig. 5:** Imagem representativa da administração de formalina orofacial. Uma solução diluída com salina e formalina ao 5%, é aplicada ou injetada na área das vibrissas do animal. Essa aplicação desencadeia uma resposta inflamatória localizada, resultando em uma sensação dolorosa na região facial do animal.

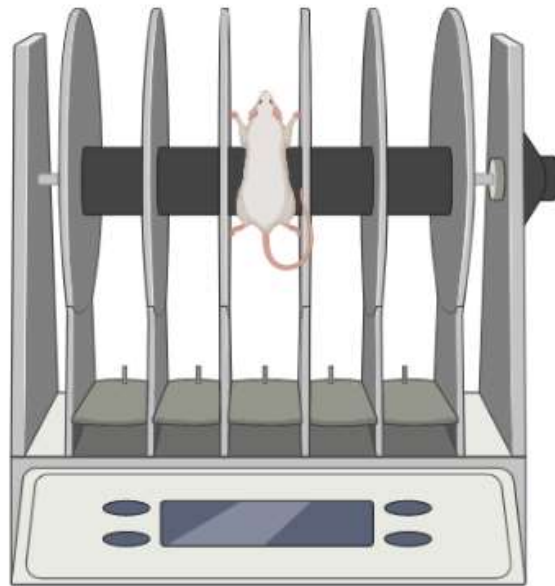
### III-2.4. TESTE COMPORTAMENTAL MOTOR

#### III-2.4.1 ROTA-ROD

O teste do Rota-Rod (Fig. 6) foi realizado para avaliar os possíveis efeitos da Carbamazepina, do CBD e do PECS-101 na atividade motora. As mudanças no desempenho motor foram medidas utilizando um aparelho de rotação acelerada para ratos (Ugo Basile, modelo 7750, Comerio, Itália). Os animais foram treinados durante dois dias no aparelho. O

Rota-Rod foi testado antes da cirurgia para obter um desempenho basal (Dia -7), após a cirurgia (Dia 21) e no último dia de tratamento (Dia 28), 30 minutos após receberem Carbamazepina, PECS-101, CBD (3, 10, 30 mg/kg) ou veículo (intraperitonealmente). Os ratos foram colocados no bastão rotatório e a velocidade de rotação foi ajustada para aumentar linearmente de 4 a 17 rpm ao longo de 2 minutos e, em seguida, permaneceu em 20 rpm por 5 minutos. O tempo até a queda do bastão foi registrado. O pesquisador responsável pelos testes comportamentais estava cego em relação aos tratamentos recebidos por cada animal.

**Fig. 6** – Teste para avaliação de coordenação motora do animal



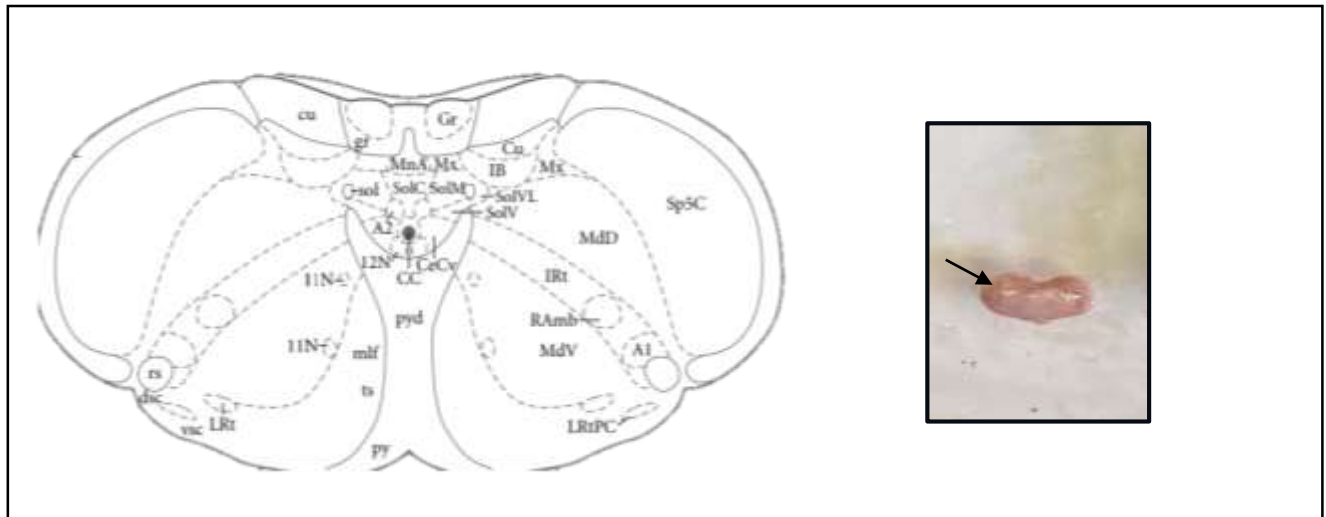
**Fig. 6:** Imagem ilustrativa do aparelho Rota-Rod, (teste de rotação cilindro). consiste em um cilindro horizontal ou uma barra giratória, geralmente revestida com material antiderrapante para garantir a aderência do animal. O animal é colocado e estimulado a caminhar enquanto o cilindro gira. A performance é medida pelo tempo que o animal consegue permanecer no cilindro antes de cair, sendo registrado automaticamente pelo equipamento ou manualmente por um observador.

### III-2.5. EUTANÁSIA, COLETA E PROCESSAMENTO DE TECIDOS

Ao final das análises comportamentais, os animais foram anestesiados conforme descrito abaixo e em seguida, decapitados imediatamente. A decapitação foi escolhida por ser um procedimento rápido e que não causa dor ou sofrimento ao animal. Os animais foram previamente sedados e anestesiados (tiopental 40 mg/kg e cloridrato de lidocaína 10 mg/kg

intraperitonealmente (Holson, 1992; van Rijn et al., 2011). O Sp5c foi microdissecado (Fig. 7) em uma placa de dissecação resfriada com gelo, com auxílio de uma lupa (Leica Zoom 2000) e imediatamente congelado em nitrogênio líquido (-196 °C). As amostras de tecido foram armazenadas a -80 °C até o uso.

**Fig. 7** – Coleta do subnúcleo caudal trigeminal (Sp5c)



**Fonte:** Retirado de: The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates 5th Edition Paxinos & Watson. Dissecação do Sp5c do lado direito, indicado pela flecha (autoria própria).

### III-2.6. WESTERN BLOTTING

O Sp5c foi homogeneizado (sistema de homogeneização POLYTRON® PT 2100, Kinematic AG, Lucerna, Suíça) com tampão M-PER (9000 µl) (#78501; Invitrogen) contendo um coquetel inibidor de proteases e fosfatases (100 µl) (#78440; Invitrogen). Os homogeneizados foram centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Os sobrenadantes foram recuperados para medição da concentração de proteínas usando o ensaio de Bradford (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad, Alemanha). As proteínas (30 µg) foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE de 10%) e transferidas para uma membrana de nitrocelulose utilizando a técnica de transferência semiseca. As membranas de nitrocelulose foram incubadas a 4 °C durante a noite usando o anticorpo anti-TRPV1 (1:1000; Novus Biologicals, NB100-1617), com o anticorpo anti- $\alpha$ -tubulina como controle (1:4000, Cell Signaling Technology, EUA). Os anticorpos primários

foram detectados com um anticorpo secundário conjugado com peroxidase (anti-coelho, 1:4000). As bandas foram visualizadas por quimioluminescência aprimorada (ECL, Amersham, Reino Unido) e quantificadas com o software IMAGEJ (dos-Santos-Pereira et al., 2018). Unidades arbitrárias (U.A.) representaram a análise de densidade integrada extraída das intensidades das bandas da proteína TRPV1, normalizadas pela expressão de suas respectivas bandas de tubulina.

### III-2.7. CÁLCULO AMOSTRAL / DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Calculamos o número amostral considerando referência publicada que utiliza o mesmo modelo experimental (devidamente citada no texto – (Krzyzanowska et al., 2011) para o estabelecimento do desvio padrão ou as frequências populacionais da variável. Utilizamos a seguinte fórmula para calcular o tamanho da amostra (n) para que se obtenha uma estimativa confiável da média populacional (de acordo com Miot, 2011 - J Vasc Bras 2011, Vol. 10, Nº 4):

$$n = (Z\alpha/2 \cdot \delta / E)^2$$

Onde:

n – tamanho da amostra;

$Z\alpha/2$  – valor crítico para o grau de confiança desejado, usualmente: 1,96 (95%);

$\delta$  – desvio padrão populacional da variável;

E = Diferença máxima estimada entre a média amostral e a verdadeira média populacional.

É a margem de erro ou erro máximo de estimativa.

Para nosso desenho experimental, obtivemos o seguinte cálculo:

$$n = (1,96 \times 7/5)^2 = 7,52 \text{ por grupo.}$$

Considerando a contemplação dos objetivos deste estudo, temos o n total de 217 ratos, como descrito a nos protocolos experimentais abaixo.

### III-2.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos testes comportamentais foi realizada por meio de ANOVA de dois fatores. As comparações entre os dias antes e depois da cirurgia, assim como após os tratamentos, foram avaliadas por meio de análise de variância de medidas repetidas (RM-ANOVA de dois fatores). No caso de um efeito significativo dos tratamentos, o teste

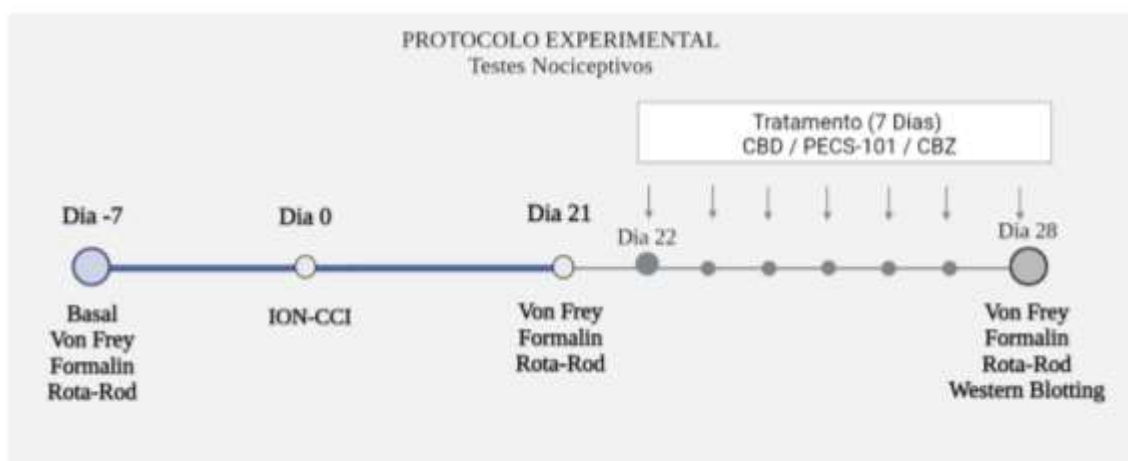
Bonferroni post-hoc foi utilizado para comparações múltiplas. Para a análise do western blotting, utilizamos a análise univariada de variância para medidas independentes (ANOVA unifatorial), seguida pelo teste Bonferroni post-hoc. Todas as análises estatísticas foram conduzidas utilizando o software GraphPad Prism 6. Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (SEM), sendo que os pontos representam os dados de animais individuais. Os testes estatísticos estão detalhados nas legendas das figuras.

### III-2.9. LINHAS EXPERIMENTAIS

#### III-2.9.1. LINHA EXPERIMENTAL 1:

Como primeiro passo para o desenvolvimento experimental do estudo, realizamos uma avaliação da resposta de alodinia e hiperalgesia mecânica em animais usando um modelo de neuralgia trigeminal que foram tratados com CBD, PECS-101 e Carbamazepina. No dia anterior à cirurgia para IoN-CCI, 21 dias após a cirurgia IoN-CCI e, por último, no dia 28 após o tratamento. Os animais foram submetidos ao teste de von Frey e formalina no lado ipsilateral da lesão. O teste de coordenação motora foi realizado utilizando o Rota Rod, no dia anterior à cirurgia, 21 dias após a lesão e 28 dias após o tratamento.

**Figura 8** - Desenho experimental representando o protocolo geral de avaliação de testes nociceptivos mecânico em animais tratados com CBD, HUF e CBZ



**Fig. 8:** Ratos Hannover foram utilizados para este modelo. Os animais foram avaliados por teste nociceptivo (alodinia mecânica - Von Frey Orofacial e hiperalgesia mecânica - formalina). Basal: antes de serem submetidos

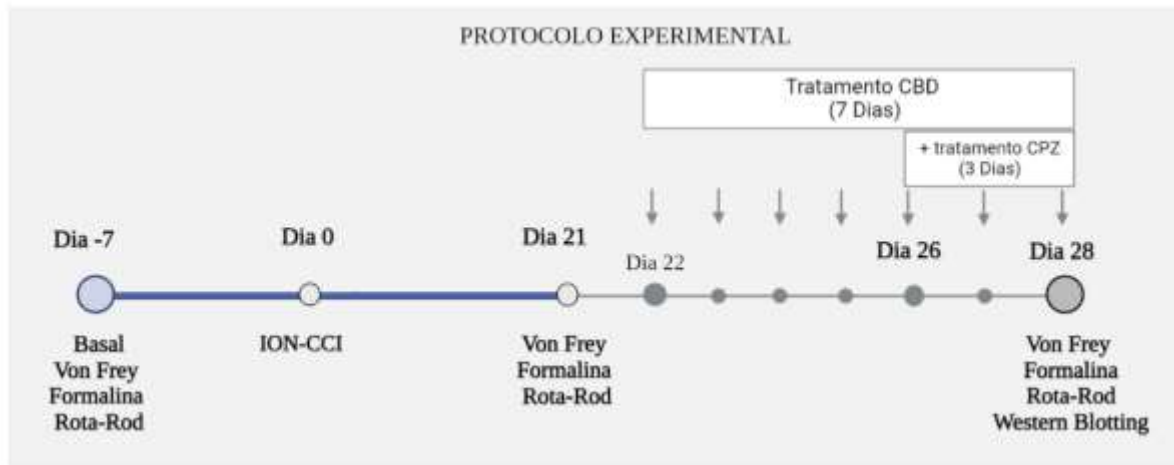


à cirurgia para indução da neuralgia trigeminal por constrição do nervo infraorbitário; 21 dias após a cirurgia e 28 dias depois do tratamento. Criado pelo próprio autor usando o software Biorender.

### III-2.9.2. LINHA EXPERIMENTAL 2:

No segundo desenho experimental, realizamos uma avaliação da resposta de alodinia e hiperalgisia mecânica em animais utilizando um modelo de neuralgia trigeminal e tratados com CBD em conjunto com Capsazepina. Essa avaliação foi conduzida no dia anterior à cirurgia para IoN-CCI (n = 7) ou nos animais Sham (n = 7), 21 dias após a cirurgia IoN-CCI e, por fim, no dia 28 após o tratamento. Durante essas etapas, os animais foram submetidos ao teste de von Frey e formalina no lado ipsilateral da lesão. Além disso, realizamos o teste de coordenação motora utilizando o Rota Rod, no dia anterior à cirurgia, 21 dias após a lesão e 28 dias após o tratamento. Para a análise molecular, os tecidos foram coletados para o western blotting no dia 28 (após o tratamento).

**Figura 9** - Figura - Desenho experimental representando o protocolo geral de avaliação de testes nociceptivos mecânico em animais tratados com CPZ + CBD



**Fig. 9** : Ratos Hannover foram utilizados para este modelo. Os animais foram avaliados por teste nociceptivo (alodinia mecânica - Von Frey Orofacial e hiperalgisia mecânica - formalina). Basal: antes de serem submetidos à cirurgia para indução da neuralgia trigeminal por constrição do nervo infraorbitário ; 21 dias após a cirurgia e 28 dias depois do tratamento. Criado pelo próprio autor usando o software Biorender.

### **III-2.10. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS**

#### **III-2.10.1 Experimento 1: Impacto da administração subcrônica de CBD, PECS-101 ou CBZ na expressão de alodinia e hiperalgesia uma vez que a lesão IoN-CCI estava presente.**

O objetivo deste experimento foi analisar o efeito antinociceptivo dos medicamentos CBD, PECS-101 e Carbamazepina sobre alodinia e hiperalgesia orofaciais induzidas por IoN-CCI (**n=98 ratos neste protocolo**). Antes da cirurgia, no dia -7, sem nenhum tratamento farmacológico, os animais foram avaliados nos testes de Von Frey e Formalina para obter uma medida de referência (linha de base). No dia 0, os animais foram submetidos à cirurgia de IoN-CCI. 21 dias após a cirurgia, os ratos foram avaliados nos testes de Von Frey e Formalina novamente para obter uma medida pós-operatória. Os animais foram divididos aleatoriamente em 14 grupos (n=7 por grupo): VEH, SHAM/CBD30, SHAM/PECS30, SHAM/CBZ30 (Esses animais foram Sham-operados submetidos aos mesmos testes); IoN-CCI + VEH, IoN-CCI + CBD3, IoN-CCI + CBD10, IoN-CCI + CBD30; IoN-CCI + PECS3, IoN-CCI + PECS10, IoN-CCI + PECS 30; IoN-CCI + CBZ3, IoN-CCI + CBZ10, IoN-CCI + CBZ30. Cada grupo recebeu uma única dose do medicamento uma vez ao dia durante 7 dias. Finalmente, após os catorze grupos receberem seus respectivos tratamentos, eles foram novamente avaliados nos testes de Von Frey e Formalina (Dia -7, 21 e 28). Para análise da expressão dos receptores TRPV1 em Sp5c por western immunoblotting, os seguintes grupos experimentais deste protocolo foram incluídos: VEH, SHAM/CBD30, IoN-CCI + VEH, IoN-CCI + CBD3, IoN-CCI + CBD10, IoN-CCI + CBD30; SHAM/PECS30; IoN-CCI + PECS3, IoN-CCI + PECS10, IoN-CCI + PECS30.

#### **III-2.10.2 Experimento 2: Impacto de doses subefetivas de CBD associadas ao CPZ na alodinia e hiperalgesia e expressão dos receptores TRPV1 no núcleo trigeminal espinal.**

Devido aos efeitos anti-nociceptivos do CBD e do PECS-101 acompanhados por uma redução dos receptores TRPV1 no Sp5c detectados no protocolo anterior, nosso objetivo neste momento foi investigar a influência do receptor TRPV1 sobre as doses subefetivas de CBD na neuralgia trigeminal. Neste experimento, procuramos analisar se a administração intraperitoneal das doses subefetivas de CBD (3,10 mg/kg) associadas a capsazepina (CPZ -

antagonista seletivo de TRPV1) pode induzir efeitos antinociceptivos no modelo IoN-CCI em ratos (**n=35 ratos neste protocolo**). Antes da cirurgia, no dia -7, sem nenhum tratamento farmacológico, os animais foram avaliados nos testes de Von Frey e Formalina para obter uma medida basal. No dia 0, os animais foram submetidos à cirurgia de IoN-CCI. 21 dias após a cirurgia, os grupos foram avaliados novamente nos testes de Von Frey e Formalina para obter a medida pós-operatória. Os animais foram divididos aleatoriamente em 5 grupos (n = 6 por grupo): VEH; IoN-CCI + VEH; IoN-CCI + CPZ; IoN-CCI + CPZ + CBD3 e IoN-CCI + CPZ + CBD10. Cada grupo recebeu CBD ou seu veículo uma vez ao dia por sete dias consecutivos. Os grupos selecionados para o tratamento combinado receberam CPZ (5 mg/kg) 30 minutos antes da administração de CBD durante os últimos três dias de tratamento. Finalmente, após os grupos receberem o tratamento correspondente, os testes de Von Frey e Formalina foram novamente avaliados (Dia 28). Para análise da expressão dos receptores TRPV1 em Sp5c por western immunoblotting, os seguintes grupos experimentais deste protocolo foram incluídos: VEH; IoN-CCI; IoN-CCI + CPZ + CBD3 e IoN-CCI + CPZ + CBD10.

### **III-2.10.3 Experimento 3: Impacto da administração repetida de CBD, PECS-101 ou CBZ e associação CPZ + CBD na coordenação motora uma vez que a IoN-CCI estava presente.**

Um experimento independente foi realizado para analisar os efeitos dos tratamentos farmacológicos utilizados neste estudo (CBD, PECS-101, Carbamazepina e associação Capsazepina + CBD) na coordenação motora (**n=84 ratos neste protocolo**). O objetivo deste experimento foi comparar o efeito das drogas com Carbamazepina, que já demonstrou em estudos anteriores alterações no desempenho motor usando o teste do rotarod (Idänpään-Heikkilä & Guilbaud, 1999; Pineda-Farias et al., 2021; Çankal et al., 2021). O teste do rotarod foi realizado nos animais antes da cirurgia para obter uma resposta basal (Dia -7). No dia 0, os animais foram submetidos à cirurgia de IoN-CCI. 21 dias após a cirurgia, o teste do rotarod foi avaliado (pós-operatório) e também após sete dias de tratamento (Dia 28). Testamos aqui 12 grupos de animais (n = 7 por grupo): IoN-CCI + CBD3, IoN-CCI + CBD10, IoN-CCI + CBD30; IoN-CCI + PECS3, IoN-CCI + PECS10, IoN-CCI + PECS30; IoN-CCI + CBZ3,

IoN-CCI + CBZ10, IoN-CCI + CBZ30; IoN-CCI + CPZ, IoN-CCI + CPZ + CBD3 e IoN-CCI + CPZ + CBD10.

## **IV. RESULTADOS**

---

#### **IV-1. IoN-CCI provoca alodinia mecânica orofacial e os canabinóides previnem esta resposta**

A Figura 10A ilustra a linha temporal referente a este protocolo experimental. Como esperado, a lesão IoN-CCI induziu alodinia mecânica orofacial. O teste de Von Frey indicou que o limiar mecânico orofacial foi reduzido após 21 dias de IoN-CCI, em comparação com a medida inicial (Basal -  $P < 0,05$ , Fig. 10).

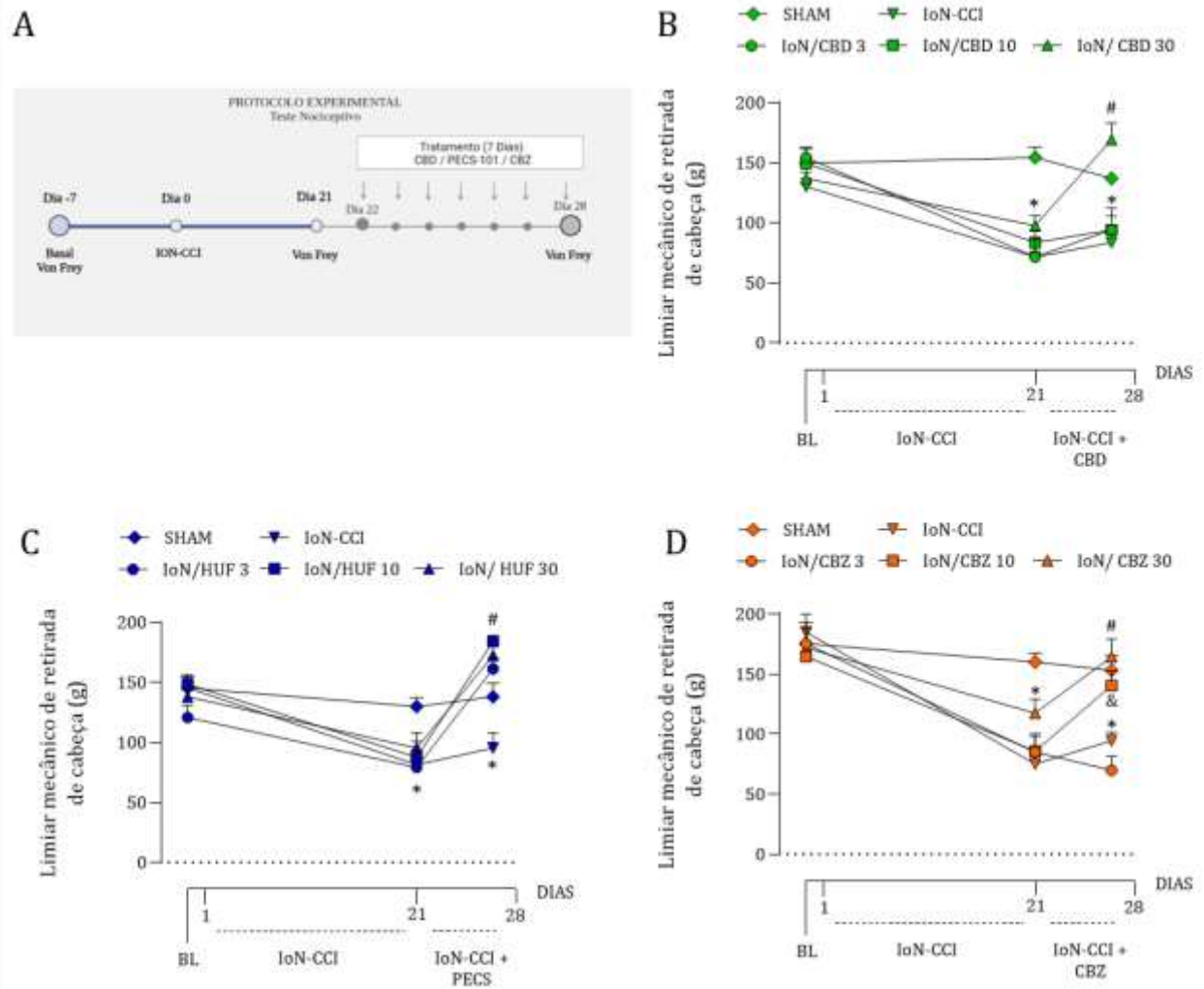
Os tratamentos com CBD, PECS-101 e Carbamazepina foram testados na alodinia mecânica orofacial induzida por IoN-CCI. Não houve efeito significativo do CBD nas doses de 3 e 10mg/kg na alodinia mecânica, enquanto a dose mais alta, 30mg/kg, aumentou o limiar mecânico orofacial em comparação com a medida pós-operatória (IoN-CCI, Figura 10B, aumento de 64%) com efeitos no tratamento ( $F(2, 54) = 5,032$ ,  $P=0,0099$ ); tempo ( $F(2, 54) = 20,83$ ,  $P<0,0001$ ) e uma interação entre eles ( $F(4, 54) = 4,954$ ,  $P=0,0018$ ).

A administração de PECS-101, nas três doses (3, 10, 30 mg/kg), diminuiu a alodinia mecânica em comparação com a medida pós-operatória (aumento no limiar de 69%; 65%; 73% respectivamente;  $P < 0,05$  Fig.10C). Houve efeito no tratamento ( $F(2, 54) = 2,783$ ,  $P=0,0407$ ) e tempo ( $F(2, 54) = 27,21$ ,  $P<0,0001$ ).

A dose mais baixa de Carbamazepina, 3mg/kg, não foi capaz de reverter a alodinia mecânica em comparação com as doses de 10 e 30mg/kg (Figura 10D). O tratamento com Carbamazepina em 10 e 30 mg/kg aumentou o limiar de alodinia mecânica orofacial em comparação com a medida pós-operatória (IoN-CCI, Figura 10D, aumento de 71% e 40% respectivamente) com efeitos no tratamento ( $F(2, 54) = 11,74$ ,  $P<0,0001$ ); tempo ( $F(2, 54) = 19,10$ ,  $P<0,0001$ ) e uma interação entre eles ( $F(4, 54) = 7,182$ ,  $P=0,0001$ ).

Os grupos VEH, SHAM + CBD30 e SHAM + PECS-101 não apresentaram mudanças significativas no limiar mecânico orofacial, indicando que os efeitos antinociceptivos do CBD e PECS-101 sobre a alodinia são dependentes da lesão (Tabela 9). A Carbamazepina, por outro lado, na dose de 30mg/kg aumentou o limiar de alodinia mecânica orofacial em animais Sham-operados ( $P<0,05$ , Tabela 9), com efeito no tempo ( $F(1,444, 37,55) = 17,65$ ,  $P<0,0001$ ).

**Figura 10** – Resposta farmacológica do CBD, PECS-101 e Carbamazepina sobre a alodinia mecânica orofacial.



**Fig. 10:** Efeito do CBD, PECS-101 e Carbamazepina sobre as respostas de alodinia orofacial em ratos submetidos à IoN-CCI. (A) Linha experimental dos testes nociceptivos, cirurgia e sequência de tratamento. (B) Efeito do tratamento com canabidiol (3, 10, 30mg/kg) na alodinia mecânica. A dose de 30 mg/kg de CBD foi eficaz em relação a medida pós-operatória. (C) Efeito do tratamento com PECS-101 (3, 10, 30mg/kg) na alodinia mecânica. Todas as doses foram eficazes. (D) Efeito do tratamento com Carbamazepina (3, 10, 30mg/kg) na alodinia mecânica. Apenas as doses de 10 e 30mg/kg foram eficazes. SHAM é o grupo de animais Sham-operados e IoN-CCI é o grupo de animais lesionados e tratados com veículo. Os dados são apresentados como média ± SEM. \*P < 0,05 em relação à medida basal (BL); #P < 0,05 em relação ao Dia 21 (medida pós-operatória); &P < 0,05 em relação ao grupo IoN-CBZ 30. Testes estatísticos: RM Two Way ANOVA, Bonferroni post-hoc; Variáveis: tempo e tratamento. Os resultados de SHAM+CBD30; SHAM+PECS30; SHAM+CBZ 30 estão apresentados na Tabela 1. CBD: Canabidiol; PECS: Canabidiol sintético fluorado; CBZ: Carbamazepina.

**Tabela 9** - Limiar de retirada de cabeça – alidinia mecânica – Von Frey

GRUPOS EXPERIMENTAIS	(Dia 0 - Basal)	(Dia 21)	(Dia 28)
Sham + CBD 30	236,3 ± 16,93	262,4 ± 17,81	258,5 ± 15,08
Sham + PECS 30	268,9 ± 17,047	307,2 ± 21,65	279,6 ± 5,793
Sham + CBZ 30	232,4 ± 6,508	251,8 ± 5,619	325,2 ± 10,09 <sup>#</sup>

Fonte: Elaborado pelo próprio autor. SHAM: Animais Sham-operados; CBD: Canabidiol; PECS: Canabidiol sintético fluorado; CBZ: Carbamazepina. <sup>#</sup>P<0,05 comparado ao dia 21.

#### IV-2. IoN-CCI provoca hiperalgesia orofacial e os canabinóides previnem esta resposta

A Figura 11A ilustra a linha temporal referente a este protocolo experimental. A coceira orofacial em resposta a de formalina a 5% foi analisada neste experimento. A lesão de IoN-CCI aumentou a hiperalgesia orofacial após 21 dias de IoN-CCI, em comparação com a medida inicial (Basal -  $P < 0,05$ , Figura 11B-D).

O CBD, nas doses de 3, 10 e 30mg/kg, reduziu a hiperalgesia orofacial induzida por IoN-CCI em comparação com a medida pós-operatória (IoN-CCI, Figura 11B) na segunda fase do teste da formalina, nos períodos entre 20 e 40 minutos da análise, com efeitos no tratamento ( $F(4, 30) = 3,982$ ,  $P=0,0104$ ) e tempo ( $F(5, 704, 171,1) = 2,646$ ,  $P=0,0195$ ).

A administração de PECS-101, nas três doses (3, 10, 30 mg/kg), reverteu a hiperalgesia orofacial na segunda fase do teste em comparação com a medida pós-operatória ( $P < 0,05$  Figura 11C). Houve uma diminuição significativa na hiperalgesia com um efeito principal no tratamento ( $F(4, 30) = 8,886$ ,  $P<0,0001$ ) e tempo ( $F(5, 010, 150,3) = 6,141$ ,  $P<0,0001$ ).

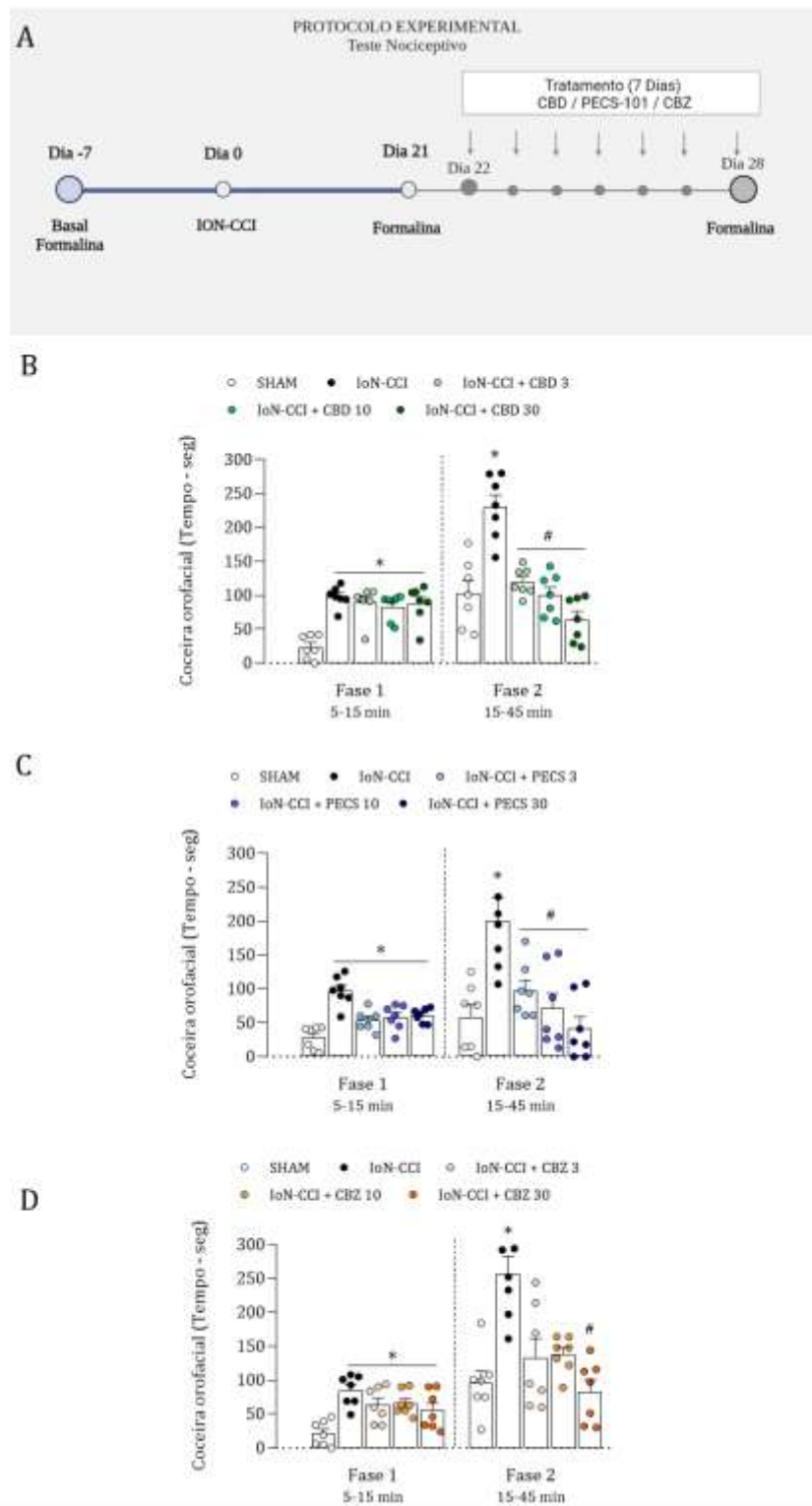
A menor dose de Carbamazepina, 3mg/kg, não foi capaz de reduzir a hiperalgesia orofacial em comparação com as doses de 10 e 30mg/kg (Figura 11D). Carbamazepina na dose de 10mg/kg reduziu a hiperalgesia orofacial aos 20 e 40 minutos do teste de formalina. Carbamazepina em 30mg/kg reduziu a hiperalgesia orofacial aos 20, 25, 35, 40 e 45 minutos



do teste de formalina. Carbamazepina apresentou efeito no tratamento ( $F(4, 30) = 3,494$ ,  $P=0,0186$ ) e tempo ( $F(6,098, 182,9) = 4,034$ ,  $P=0,0007$ ).

CBD, PECS-101 e Carbamazepina (30mg/kg) reduziram a coceira orofacial em animais submetidos a cirurgia SHAM, sugerindo um efeito de tratamento sobre a inflamação induzida pela formalina ( $P<0,05$ , Tabela 10).

**Figura 11** – Resposta farmacológica do CBD, PECS-101 e Carbamazepina sobre a hiperalgesia orofacial.



**Fig. 11:** Efeito do CBD, PECS-101 e Carbamazepina sobre as respostas hiperálgicas orofaciais em ratos IoN-CCI. (A) Linha experimental dos testes nociceptivos, cirurgia e seqüência de tratamento. (B) Efeito do

tratamento com CBD (3, 10, 30mg/kg) sobre a hiperalgesia orofacial. As doses de 3, 10 e 30 mg/kg de CBD foi eficaz na segunda fase do teste. (C) Efeito do tratamento com PECS-101 (3, 10, 30mg/kg) na hiperalgesia orofacial. As doses de 3, 10 e 30 mg/kg de PECS-101 foi eficaz na segunda fase do teste. (D) Efeito do tratamento com Carbamazepina (3, 10, 30mg/kg) na hiperalgesia orofacial. As doses de 10 e 30mg/kg foram eficazes. SHAM é o grupo de animais Sham-operados e IoN-CCI é o grupo de animais lesionados e tratados com veículo. Os dados são apresentados como média  $\pm$  SEM. \* $P < 0,05$  em relação ao grupo IoN-CCI + VEH. Testes estatísticos: RM Two Way ANOVA; Bonferroni post-hoc; Variáveis: tempo e tratamento. Os resultados de SHAM+CBD30; SHAM+PECS30; SHAM+CBZ 30 estão apresentados na Tabela 2. CBD: Canabidiol; PECS: Canabidiol sintético fluorado; CBZ: Carbamazepina.

**Tabela 10** – Resposta hiperalgésica orofacial – Teste da Formalina

GRUPOS EXPERIMENTAIS	DIA 0	DIA 21	DIA 28	DIA 0	DIA 21	DIA28
	Fase I			Fase II		
Sham + CBD 30	57,00 $\pm$ 14,47	70,14 $\pm$ 11,07	55,14 $\pm$ 15,95	65,14 $\pm$ 7,942	60,43 $\pm$ 10,41	16,14 $\pm$ 8,413*
Sham + PECS 30	67,14 $\pm$ 7,430	90,00 $\pm$ 7,678	50,29 $\pm$ 7,524	83,00 $\pm$ 23,24	106,0 $\pm$ 14,94	38,14 $\pm$ 9,035*
Sham + CBZ 30	63,14 $\pm$ 15,22	49,00 $\pm$ 8,309	19,00 $\pm$ 7,982*	89,29 $\pm$ 13,95	91,00 $\pm$ 19,27	34,43 $\pm$ 12,07*

Fonte: Elaborado pelo próprio autor. SHAM: Animais Sham-operados; CBD: Canabidiol; PECS: Canabidiol sintético fluorado; CBZ: Carbamazepina. \* $P < 0,05$  comparado ao dia 21.

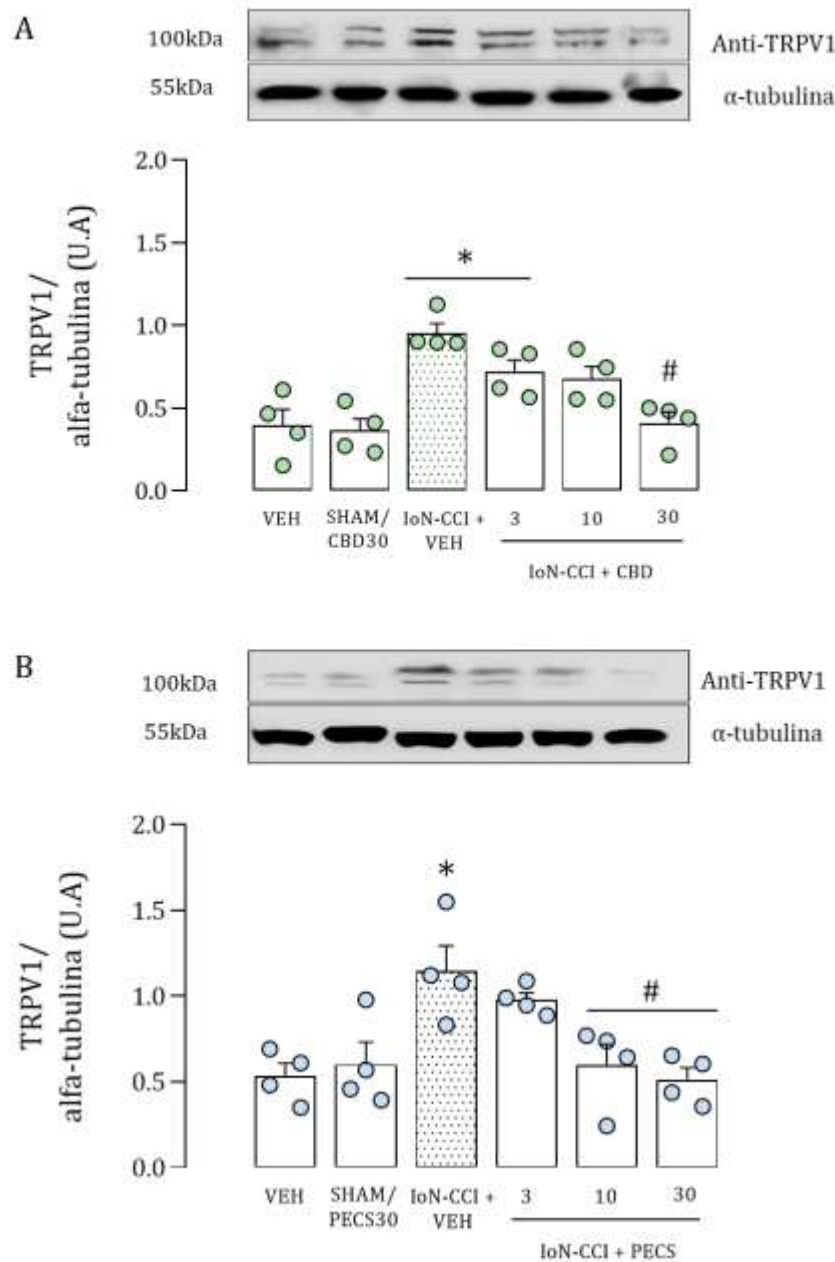
### IV-3. O CBD e o PECS-101 reduzem a nociceção induzida por IoN-CCI ao atuarem na expressão do receptor TRPV1 no Subnúcleo caudal do Núcleo Espinal do Trigêmeo (Sp5c).

Foram investigadas possíveis alterações nos receptores TRPV1 no Sp5c neste estudo. A Figura 12A ilustra a linha temporal referente a este protocolo experimental. A expressão da proteína TRPV1 foi determinada por análise de Western blotting. Nas espécimes examinadas, o anticorpo para TRPV1 detectou banda constante, em torno de 100 kDa. O grupo experimental IoN-CCI apresentou um aumento na expressão de TRPV1 no Sp5c em comparação com os grupos VEH e SHAM ( $P < 0,01$ , Figura 12B, C).

O CBD na dose de 30 mg/kg reverteu os níveis de proteína TRPV1 ( $P < 0,01$ , Figura 12A). Houve um efeito no tratamento ( $F(5, 18) = 10,15$ ,  $P = 0,0001$ ). As doses de 3 e 10 mg/kg não tiveram efeito significativo nesta análise (Figura 12A). Duas doses de PECS-101

mostraram efeitos positivos na expressão de TRPV1 no Sp5c. PECS-101 nas doses de 10 e 30 mg/kg reverteu os níveis de proteína TRPV1 ( $P < 0,01$ , Figura 12B). Houve um efeito no tratamento ( $F(5, 18) = 6,401$ ,  $P = 0,0014$ ). A dose de 3 mg/kg não apresentou efeito significativo nesta análise (Figura 12B).

**Figura 12** – Análise de expressão de proteína TRPV1 no subnúcleo caudal do núcleo espinal do trigêmeo.



**Fig. 12:** PECS-101 e CBD reduziram a expressão de TRPV1 em SP5c. (A) Impacto do tratamento com CBD (30 mg/kg) na redução da expressão de proteína dos receptores TRPV1. (B) PECS-101 reduziu a expressão do receptor TRPV1 nas doses de 10 e 30 mg/kg. Os dados são apresentados como média  $\pm$  SEM. \* $P < 0,05$  em

relação ao grupo VEH e SHAM+CBD; #P < 0,001 em relação ao grupo IoN-CCI + VEH. Testes estatísticos: One-Way ANOVA, Bonferroni post-hoc.

#### **IV-4. A associação de um antagonista seletivo do TRPV1 (Capsazepina) com doses subefetivas de CBD atenua a alodinia mecânica e a hiperalgisia orofacial induzidas por IoN-CCI.**

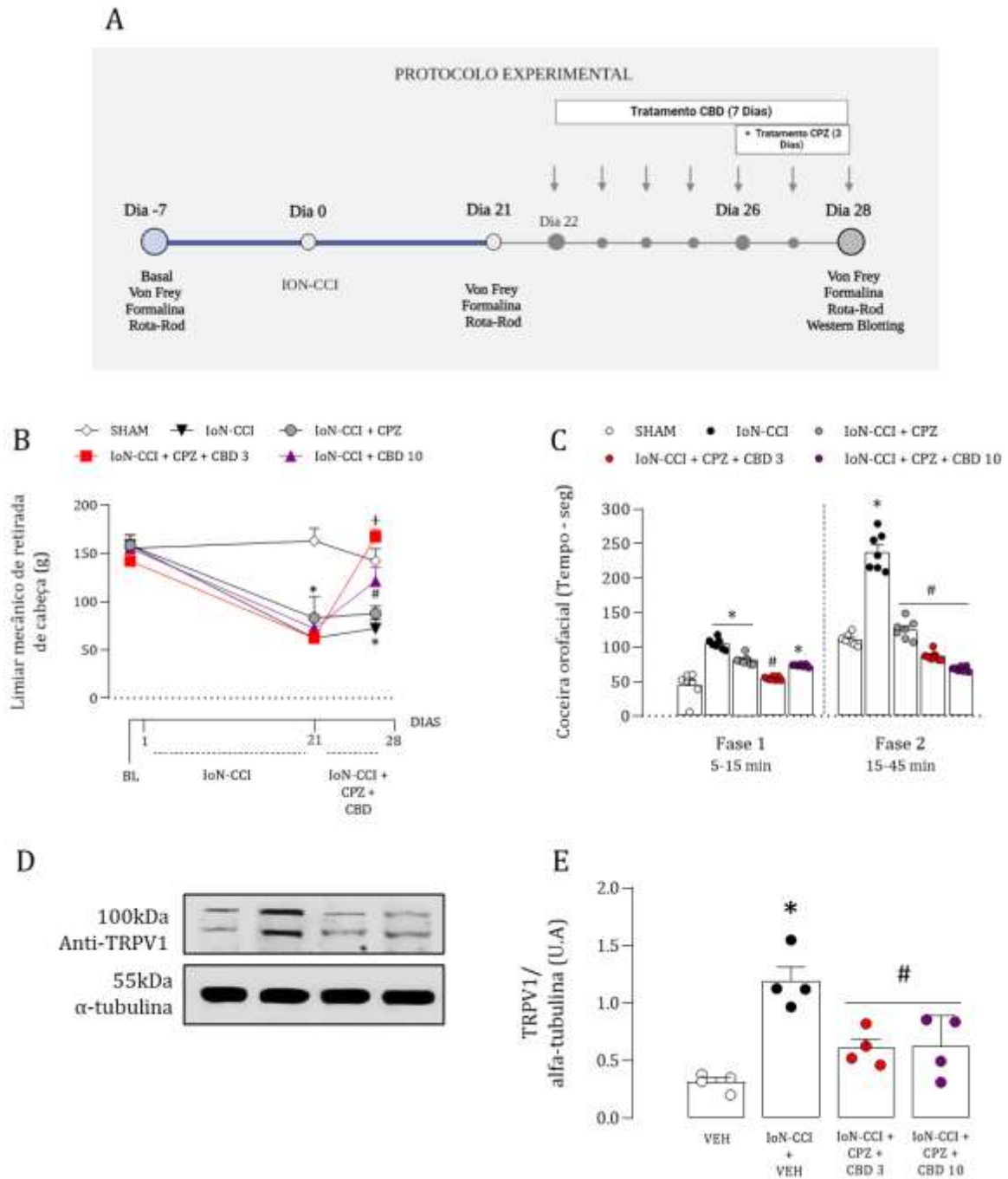
Para investigar se a modulação dos receptores vaniloides TRPV1 poderia ser responsável pela falta de efeitos anti-nociceptivos do CBD na alodinia orofacial, nas doses de 3 e 10 mg/kg, foi administrado um antagonista do TRPV-1, Capsazepina (5 mg/kg i.p.), associado ao CBD (3 e 10 mg/kg i.p.) em ratos com lesão (Figura 13). A Figura 13A ilustra a linha temporal referente a este protocolo experimental.

Os resultados indicaram um efeito geral da associação das drogas no limiar de alodinia mecânica orofacial (Figura 13B, C). A Capsazepina (5 mg/kg) administrada antes das doses subefetivas de CBD (3 e 10 mg/kg) aumentou significativamente o limiar mecânico orofacial induzido por IoN-CCI (aumento de 65% e 30%, respectivamente;  $P < 0,05$ ; Figura 13B). Houve um efeito no tempo ( $F(2, 45) = 28,43$ ,  $P < 0,0001$ ). A administração isolada de CPZ não foi suficiente para induzir o efeito antinociceptivo nas respostas de alodinia.

Em uma segunda análise, investigamos o curso temporal dessas drogas no teste de nocicepção induzida por formalina (Figura 13C). Os resultados mostraram uma redução significativa do comportamento induzido pela formalina nas fases I e II com a associação de Capsazepina e CBD. A associação de Capsazepina e CBD na dose de 3 mg/kg foi eficaz em reduzir a hiperalgisia orofacial em todos os pontos de tempo analisados, com exceção de 5 minutos ( $P < 0,05$ ; Figura 13C). A dose de 10 mg/kg de CBD associada ao Capsazepina foi eficaz na primeira e segunda fase do teste de formalina em pontos específicos: 10, 15, 20 e 30 minutos ( $P < 0,05$ ; Figura 13C). Houve um efeito no tratamento ( $F(4, 25) = 7,769$ ,  $P = 0,0003$ ); tempo ( $F(4,959, 124,0) = 5,889$ ,  $P < 0,0001$ ) e uma interação entre tratamento e tempo ( $F(32, 200) = 1,477$ ,  $P = 0,0474$ ).

Essa redução na nocicepção foi acompanhada por uma redução na expressão da proteína TRPV1 no Sp5c. Como esperado, o grupo experimental IoN-CCI mostrou uma superexpressão da proteína TRPV1 em comparação com o grupo VEH ( $P < 0,05$ , Figura 13D) e a associação de Capsazepina + CBD (3 ou 10 mg/kg) foi significativamente eficaz em reduzir a expressão da proteína TRPV1 no Sp5c ( $P < 0,05$ , Figura 13D).

**Figura 13** – Resposta farmacológica da associação de antagonista de TRPV1 com doses subefetivas de CBD sobre a alodinia mecânica, hiperalgesia e expressão de proteína TRPV1 no subnúcleo caudal do núcleo espinal do trigêmeo.



**Fig. 13:** A associação de um antagonista seletivo de TRPV1 (Capsazepine) com doses subefetivas de CBD atenuou a alodinia mecânica e a hiperalgesia induzidas por IoN-CCI. (A) Linha experimental dos testes

nociceptivos, cirurgia e sequência de tratamento. (B) Efeito das doses subefetivas de CBD (3 e 10 mg/kg) com CPZ (5mg/kg) na alodinia mecânica. (C) Efeito das doses subefetivas de CBD (3 e 10 mg/kg) com CPZ (5mg/kg) na hiperalgesia. (D,E) A associação CPZ+CBD 3 e 10 mg/kg reduziu a expressão do receptor TRPV1 em SP5c. Os dados são expressos como média  $\pm$  SEM; para o teste antinociceptivo, testes estatísticos: RM Two Way ANOVA, Bonferroni post-hoc; Variáveis: tempo e tratamento. Para análise molecular, testes estatísticos: One-Way ANOVA, Bonferroni post-hoc. Teste de Von Frey: \*P < 0,05 em relação à medida basal (BL); #P < 0,05 em relação ao Dia 21 (medida pós-operatória); +P < 0,05 em relação ao grupo IoN-CCI+CBD10. Teste de formalina: \*P < 0,05 em relação aos grupos IoN-CCI + VEH e IoN-CCI + CPZ. Teste de Western Blotting: \*P < 0,05 em relação ao grupo VEH; #P < 0,05 em relação ao IoN-CCI+VEH.

#### **IV-5. Influência do CBD, PECS-101, Carbamazepina e da associação CPZ/CBD na coordenação motora.**

Vários estudos pré-clínicos têm mostrado que a dose antinociceptiva da Carbamazepina é acompanhada por disfunção motora, o que se refere a alguns dos efeitos colaterais que os pacientes com neuralgia trigeminal experimentam com o uso crônico de anticonvulsivantes. Neste estudo, o teste do Rotarod foi utilizado para a análise da coordenação motora. O desenho experimental está representado na Figura 14A.

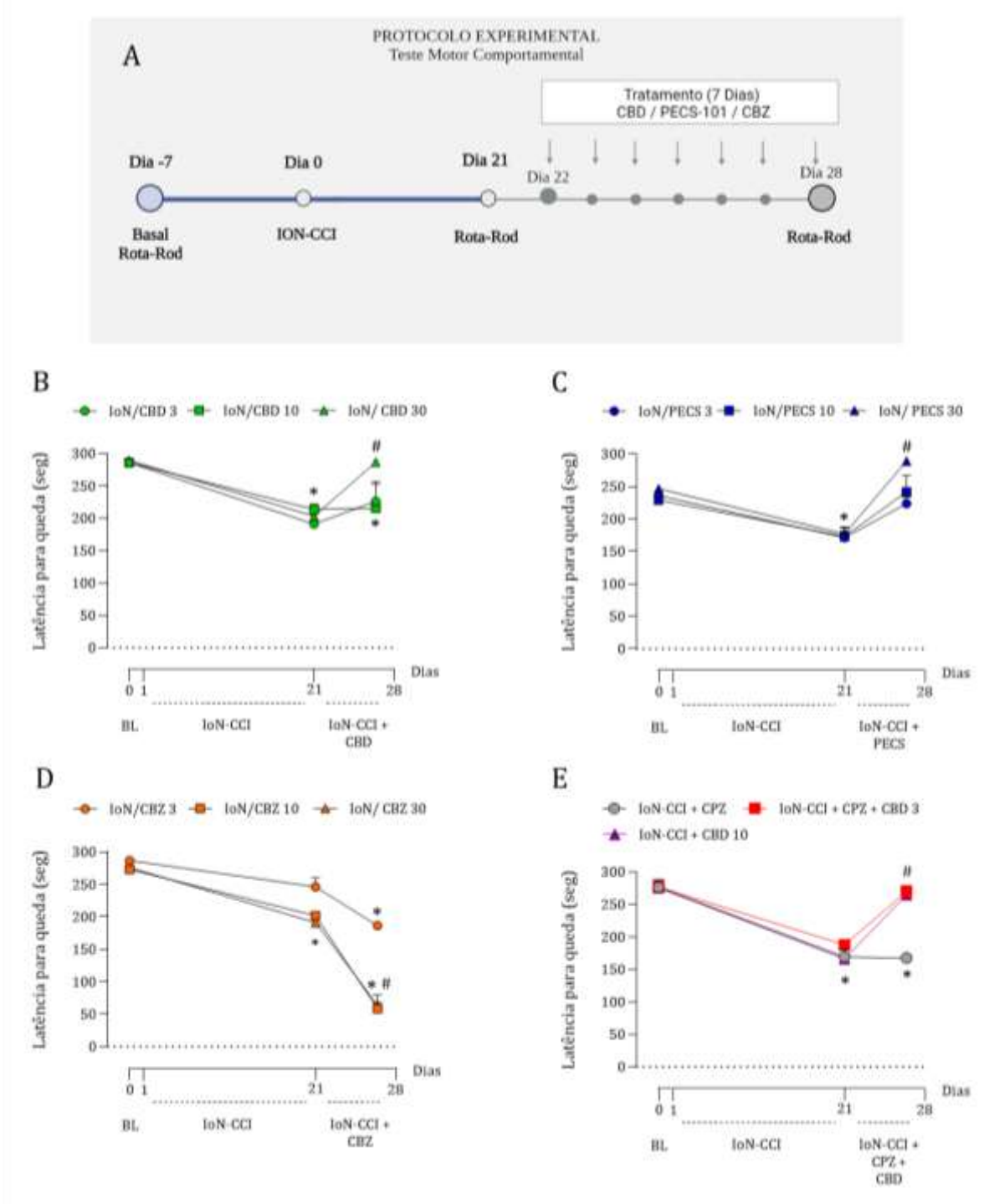
Observou-se uma diminuição significativa da coordenação motora nos animais com IoN-CCI no período pós-operatório (Dia 21) em comparação com o desempenho motor pré-operatório (BL, P < 0,05, Figura 14B-E).

O tratamento com CBD nas doses de 3 ou 10 mg/kg não alterou o comprometimento motor nos animais, em comparação com o desempenho motor pós-operatório. A dose mais alta de CBD (30 mg/kg) melhorou o desempenho no teste do Rotarod (P < 0,05, Figura 14B). O PECS-101, em todas as doses analisadas (3, 10 ou 30 mg/kg), melhorou o comprometimento motor no teste do Rotarod (P < 0,05, Figura 14C).

O tratamento sub-crônico com a carbamazepina (doses de 10 e 30 mg/kg) agravou a coordenação motora dos animais lesionados. A latência no aparelho do Rotarod dos ratos lesionados diminuiu significativamente com estas doses de Carbamazepina em comparação com o desempenho pré e pós-operatório (P < 0,05, Figura 14D).

A combinação de Capsazepina (5mg/kg) + CBD (3 e 10 mg/kg) apresentou resultados positivos para o desempenho motor dos animais lesionados (P < 0,05, Figura 14E).

**Figura 14** – Resposta Farmacológica do CBD, PECS-101 e Carbamazepina sobre a coordenação motora.



**Fig. 14:** A administração de Carbamazepina prejudica a coordenação motora dos animais. (A) Linha experimental dos testes nociceptivos, cirurgia e sequência de tratamento. (B) Efeito do tratamento com canabidiol (3, 10, 30 mg/kg) na coordenação motora. As doses de 3 e 10mg/kg de CBD mantiveram o mesmo



desempenho motor dos animais a partir do Dia 21 (medida pós-operatória), em quanto a dose de 30 mg/kg melhora o desempenho motor. (C) Efeito do tratamento com PECS-101 (3, 10, 30 mg/kg) na coordenação motora. Todas as doses melhoraram o desempenho motor dos animais a partir do Dia 21 (medida pós-operatória). (D) Efeito do tratamento com Carbamazepina (3, 10, 30 mg/kg) na coordenação motora. As doses de 10 e 30 mg/kg prejudicaram o desempenho motor dos animais a partir do Dia 21 (medida pós-operatória). (E) Ambas associações de CPZ com CBD melhoraram o desempenho motor dos animais. Os dados são apresentados como média  $\pm$  SEM. \*P < 0,05 em relação à medida basal (BL); #P < 0,05 em relação ao Dia 21 (medida pós-operatória). Testes estatísticos: RM Two Way ANOVA; Bonferroni post-hoc; Variáveis: tempo e tratamento. CBD: Canabidiol; PECS: Canabidiol sintético fluorado; CBZ: Carbamazepina.

## **V. DISCUSSÃO**

---

Este estudo mostra que compostos canabinoides naturais e sintéticos têm um efeito antinociceptivo no modelo de neuralgia trigeminal (NT) em ratos, sem causar comprometimento da coordenação motora. A carbamazepina (CBZ), terapia padrão-ouro para NT, também foi testada e apresentou efeito antinociceptivo acompanhado de prejuízo motor. A dose de 30 mg/kg de CBD alivia a alodinia mecânica, enquanto as doses de 3, 10 e 30 mg/kg de PECS-101 revertem efetivamente essa resposta. Utilizando as doses de 10 e 30 mg/kg, a CBZ atua melhorando a alodinia mecânica. As respostas de hiperalgesia induzidas por IoN-CCI foram atenuadas tanto pelo CBD quanto pelo PECS-101 nas três doses testadas, enquanto apenas as doses de 10 e 30 mg/kg de CBZ reduzem essa resposta na segunda fase do teste de formalina. Mais interessante, o tratamento com ambos os canabinoides reduziu a expressão da proteína TRPV1 no subnúcleo caudal espinal do trigêmeo caudal (SP5c). Além disso, a associação de Capsazepine (CPZ), um antagonista do TRPV1, com doses subefetivas de CBD foi altamente eficaz na redução da alodinia mecânica e da hiperalgesia, e reduziu a expressão da proteína TRPV1 no SP5c, reforçando nossos resultados anteriores, os efeitos antinociceptivos desses canabinoides são resultado de sua ação no sistema vaniloide no complexo trigeminal nesse modelo experimental.

### **PECS-101 e CBD atuam como potentes agentes farmacológicos antinociceptivos em ratos com alodinia e hiperalgesia orofacial induzidas por IoN-CCI.**

Análogos sintéticos do CBD são estruturas modificadas do CBD, como o PECS -101, que é um derivado semissintético do CBD com um átomo de flúor no anel aromático (Breuer et al., 2016). Atualmente, o desenvolvimento do CBD sintético tem recebido atenção significativa devido à intenção de aprimorar as propriedades terapêuticas do CBD. Isso é alcançado pela adição de um átomo de flúor, que está relacionado ao aumento da estabilidade da molécula, facilitando a permeabilidade do composto e demonstrando uma ação farmacológica mais potente devido à sua maior afinidade pelos receptores (Silva et al., 2017). Assim como o CBD, o PECS-101 demonstra efeitos benéficos como ansiolítico, antidepressivo, antipsicótico, neuroprotetor e antinociceptivo (Perez et al., 2018; Silva et al., 2017). Nossos dados são consistentes com a evidência de que o PECS-101 produziu efeitos antinociceptivos em doses mais baixas do que o CBD na alodinia mecânica orofacial induzida por um modelo de dor neuropática trigeminal, corroborando resultados observados na

prevenção de alodinia mecânica e térmica em um modelo de dor neuropática periférica induzida por quimioterapia (Silva et al., 2017). Outros autores indicam que, com uma administração subcrônica de CBD (3, 10, 30 mg/kg) em roedores submetidos a constrição crônica do nervo ciático, apenas a dose mais alta de CBD induziu um efeito anti-alodínico (Jesus et al., 2022).

Também é importante ressaltar que o tratamento com as três doses de CBD inibiu a resposta de hiperalgesia na segunda fase do teste da formalina. Esses dados devem ser colocados em perspectiva com estudos anteriores que mostram o CBD como um potente composto anti-hiperalgésico em outros modelos de dor a partir de doses mais baixas, como em hiperalgesia térmica induzida por injeção intraplantar de carragenina (Costa et al., 2010), a administração subcutânea miofacial de CBD em modelo de doença de Parkinson (Vivanco-Estela et al., 2021) e o teste da formalina orofacial em um modelo agudo de migrânea (Greco et al., 2023).

Apesar dos efeitos benéficos do CBD em diferentes modelos de doenças neurológicas, o potencial terapêutico desse composto continua sendo estudado devido aos seus diversos e abundantes mecanismos de ação (Mlost et al., 2020). Além disso, seu estudo tem sido desafiador porque esse composto produz uma curva dose-resposta, em que a resposta terapêutica é alcançada em uma determinada concentração, tornando difícil determinar a janela terapêutica (Gallily & Yekhtin, 2019; Zuardi et al., 2017).

O PECS -101, nas três doses testadas, também diminuiu a intensidade da hiperalgesia orofacial em consonância com descrições anteriores de estudos anteriores que abordaram modelos de dor neuropática, como no teste de hiperalgesia induzida por carragenina (Silva et al., 2017).

Nos animais tratados com carbamazepina, observamos uma redução significativa da alodinia mecânica com as doses intermediária e mais alta (10 e 30 mg/kg). Um estudo com um modelo animal de neuralgia trigeminal mostrou que o carbamazepina foi eficaz apenas em doses  $\geq 10$  mg/kg (s.c.) (Idänpään-Heikkilä & Guilbaud, 1999). Outros autores como, (Pineda-Farias et al., 2021) também constataram que o carbamazepina, na dose mais alta testada (50 mg/kg), teve uma influência significativa sobre a sensibilidade mecânica orofacial induzida pelo mesmo modelo de constrição nervosa utilizado neste estudo. Embora a carbamazepina tenha sido estabelecida clinicamente para o tratamento da dor neuropática

trigeminal, esse medicamento produz efeitos analgésicos acompanhados por muitos efeitos colaterais, dentre eles, o mais comum é a ataxia. Para avaliar alguns esse efeito do medicamento, o teste do rota rod foi utilizado neste estudo.

Conforme esperado, apenas os animais tratados com carbamazepina apresentaram comprometimento motor no desempenho no rotarod, em consonância com vários estudos que também demonstraram o comprometimento motor induzido pela administração das doses mais altas desse farmaco em modelos de neuralgia trigeminal (Idänpään-Heikkilä & Guilbaud, 1999; Jeon et al., 2012; Pineda-Farias et al., 2021). O CBD (doses de 3 e 10 mg/kg) manteve o desempenho motor estabelecido após 21 dias da lesão. O CBD, na dose de 30 mg/kg e o PECS-101, nas três doses, por outro lado, melhoraram esse desempenho no rota rod.

Um estudo de (Osuntokun et al., 2021) evidencia que essa coordenação motora prejudicada está relacionada aos efeitos de ação central dos medicamentos anticonvulsivantes, que causam uma diminuição no peso do cerebelo. Esses medicamentos também estão sendo identificados como tóxicos nessa área central por reduzirem a atividade da Superóxido Dismutase, uma importante enzima que controla os níveis de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) nas células. A maior parte das concentrações de carbamazepina administradas permanecerá ligada às proteínas plasmáticas e o medicamento entrará na corrente sanguínea a partir das reservas de tecido. Após a oxidação, a carbamazepina é convertida em carbamazepina-10,11-epóxido, que é o metabólito ativo responsável por esses efeitos tóxicos (Osuntokun et al., 2021). Por outro lado, os canabinoides (CBD e PECS -101) têm se mostrado benéficos como possíveis medicamentos terapêuticos, uma vez que sua eficácia não está acompanhada de comprometimento motor, corroborando achados anteriores (Reddy, 2023; Silva et al., 2022).

### **A redução da alodinia e hiperalgesia orofacial pelo CBD e PECS-101 está acompanhada da diminuição dos receptores TRPV1 no subnúcleo caudal do núcleo espinal do trigêmeo.**

Vinte anos após a identificação do receptor potencial transitório vaniloide 1 (TRPV1) como o primeiro membro da família de receptores potenciais transitórios (TRP) com uma conexão hipotética à dor, as evidências foram substancialmente reforçadas, indicando que

diversos canais TRP são expressos no sistema sensorial e contribuem para o desenvolvimento da dor fisiopatológica, incluindo a dor orofacial (Luo et al., 2021). De fato, vários canais iônicos TRP estão amplamente expressos no sistema sensorial trigeminal e desempenham papéis essenciais na transmissão e desenvolvimento da dor orofacial (Luo et al., 2021).

Utilizando a técnica de Western blotting, nossos dados são consistentes em mostrar que o TRPV1 é aumentado no Sp5c em ratos, 21 dias após a lesão por IoN-CCI. Corroborando esses resultados, Rossi e colaboradores (2012), utilizando o mesmo modelo animal (IoN-CCI), evidenciaram um aumento no número de neurônios do gânglio trigeminal que expressam TRPV1 duas semanas após o procedimento cirúrgico (Rossi et al., 2012). Além disso, foi observada uma elevação do RNA mensageiro do TRPV1 no gânglio trigeminal e na medula espinal cervical de ratos com IoN-CCI (Demartini et al., 2018). Ainda, nossos dados corroboram estudos que determinaram que os níveis de TRPV1 foram aumentados no núcleo espinal do trigêmeo de ratos aos 14 e 28 dias após a IoN-CCI (Wu et al., 2016).

O aumento da expressão do TRPV1 é explicado por sua ativação, que conduz a dois efeitos: despolarização e influxo de cálcio, levando à transmissão sináptica excitatória e sensibilização do receptor, provocando a intensificação central das informações nociceptivas no Sp5c, contribuindo para a dor persistente orofacial (Tamada et al., 2021).

Encontramos aqui que o aumento da expressão do TRPV1 após 21 dias de lesão do nervo infraorbitário na região do Sp5c é efetivamente reduzido pela terapia com canabinoides. O PECS-101 reduziu a expressão da proteína TRPV1 em uma dose mais baixa do que o CBD, o que pode ser explicado pela maior afinidade desse canabinoide sintético com o receptor (Jin et al., 2023). De fato, enquanto o THC interage principalmente com os receptores canabinoides CB1 e CB2, o CBD possui um perfil farmacológico mais complexo e pode interagir com múltiplos alvos moleculares envolvidos no controle da dor, o que lhe confere seus potenciais efeitos antinociceptivos. Uma dessas interações está relacionada aos receptores TRPV1. O CBD pode dessensibilizar e modular a atividade dos receptores TRPV1, aliviando a dor (Bisogno et al., 2001).

Vários estudos têm demonstrado que a ausência ou inibição dos receptores TRPV1 *in vivo* pode levar à redução do edema induzido pela inflamação, da hipersensibilidade

térmica e do comportamento nociceptivo em diferentes modelos de dor (Caterina et al., 2000; Davis et al., 2000; Keeble et al., 2005; Szabo et al., 2005).

As respostas do TRPV1 ao CBD estão associadas à dessensibilização do canal após exposição prolongada, semelhante à capsaicina. A redução da atividade neuronal do receptor com a normalização do influxo de cálcio induz um efeito analgésico paradoxal descrito em dor neuropática e doenças epilépticas (Anand et al., 2022; Etemad et al., 2022; Iannotti et al., 2014; Peng et al., 2022; Silvestro et al., 2020). A dessensibilização pode ser explicada como um processo resultante da administração prolongada de um agonista do receptor TRPV1. Isso leva a uma condição conhecida como taquifilaxia, na qual ocorre uma diminuição na responsividade do receptor. Esse fenômeno ocorre devido à internalização do receptor TRPV1, que é seguida por uma diminuição na atividade do receptor causada pela redução da entrada de cálcio na célula, o que, por sua vez, leva à dessensibilização (Koivisto et al., 2022; Sanz-Salvador et al., 2012).

A expressão reduzida de TRPV1 foi encontrada apenas na dose mais alta de CBD em nosso estudo, em conformidade com alguns resultados em cultura de neurônios do gânglio da raiz dorsal (DRG). Anand et al. (2020) encontraram uma dessensibilização dependente da dose induzida pelo CBD. O CBD inibe a sinalização de TRPV1 por meio de dois mecanismos: inibição da via do cAMP e inibição mediada por calcineurina de TRPV1 (Anand et al., 2022). Vale ressaltar que nossos achados são originais ao analisar os efeitos do PECS-101 no receptor TRPV1 em um modelo de dor neuropática trigeminal.

### **Potencial efeito da co-administração de CBD com um antagonista do TRPV1, Capsazepina, nas respostas de alodinia e hiperalgisia orofacial.**

A combinação de CBD e capsazepina (CPZ) no tratamento da neuralgia trigeminal em modelos animais é uma área que atualmente carece de estudos suficientes. Embora haja evidências limitadas sobre os efeitos dessa combinação específica em modelos de dor neuropática, mais pesquisas são necessárias para estabelecer sua potencial eficácia e segurança. Em nosso estudo, o efeito antagonista sobre o receptor TRPV1 pela CPZ foi crucial para revelar a ação anti-alodínica induzida por doses menores de CBD. Nossos dados sugerem que a combinação de doses subefetivas de CBD (3 e 10 mg/kg) com uma dose de 5mg/kg de CPZ resultou em um aumento significativo no limiar de retirada orofacial

(alodinia) e uma diminuição do comportamento hipernocifensivo (hiperalgesia) em ratos com neuralgia trigeminal induzida por IoN-CCI. Além disso, a dose menor de CBD (3 mg/kg) em associação com o CPZ produziu um maior percentual de efeitos antinociceptivos em comparação com a dose média (10 mg/kg). Essas descobertas indicam um potencial efeito sinérgico entre o CBD e o CPZ na redução da dor no modelo animal de neuralgia trigeminal.

Em nossos experimentos, o CPZ isolado (5 mg/kg) conseguiu produzir analgesia na resposta de hiperalgesia, mas não na alodinia mecânica. Corroborando nossos resultados, Urano e colaboradores (2012) demonstraram que a dor térmica, mas não a dor mecânica, induzida pela ligadura do nervo infraorbitário pode ser suprimida pela administração subcutânea do antagonista de TRPV1, a capsazepina, em uma dose mais elevada (Urano et al., 2012). Em concordância com esses achados, De Gregorio et al. (2019), utilizaram um modelo de lesão nervosa em ratos, observaram que o tratamento apenas com CPZ (1 mg/kg, i.v.) não alterou o limiar mecânico em comparação com os ratos tratados com veículo (De Gregorio et al., 2019).

O efeito do antagonismo do TRPV1 na dor trigeminal tem sido investigado em diversos modelos pré-clínicos e experimentais. A injeção do antagonista de TRPV1, AMG9810, no Sp5c, efetivamente atenuou a hiperalgesia mecânica após IoN-CCI (Kim et al., 2014). A eficácia dos antagonistas do TRPV1 em modelos de dor pré-clínicos, no entanto, varia. Alguns mostram eficácia tanto em modelos de dor inflamatória (por exemplo, dor artrítica induzida por adjuvante completo de Freund) quanto em modelos de dor neuropática (lesão dos nervos espinais L5 e L6 - modelo de CHUNG), enquanto outros foram eficazes apenas em modelos de inflamação (Koivisto et al., 2022; Moran & Szallasi, 2018; Szallasi et al., 2007).

A administração combinada de CBD e CPZ em certos estudos tem mostrado potencial para reduzir a dor. Os mecanismos exatos subjacentes à sua interação e possíveis efeitos sinérgicos ainda estão sendo investigados e podem depender da condição específica de dor e do protocolo experimental.

Um estudo anterior de nosso grupo de pesquisa mostrou que em modelo de parkinsonismo em camundongos induzido por 6-hidroxidopamina, o CBD exerceu efeitos antinociceptivos. Acredita-se que esses efeitos sejam mediados pelo aumento da ligação da anandamida, um endocanabinoide, aos receptores CB1 e TRPV1 (Crivelaro do Nascimento



et al., 2020). Curiosamente, o efeito anti-nociceptivo do CBD foi aumentado quando os receptores TRPV1 foram antagonizados com a capsazepina. O antagonismo dos receptores TRPV1 pode potencializar os efeitos analgésicos do CBD possivelmente impedindo a ativação desses receptores por outros estímulos indutores de dor.

No entanto, existem resultados contrastantes em relação à administração simultânea de CBD e do antagonista do receptor TRPV1, a CPZ, em diferentes modelos de dor.

(Costa et al., 2007) detetaram, em um modelo de dor neuropática em ratos, que a administração de capsazepina reverteu a ação anti-hiperalgésica do CBD. Isso sugere que a capsazepina contrapõe os efeitos analgésicos do CBD nesse modelo específico. Utilizando um modelo de inflamação aguda em ratos induzida pela injeção intraplantar de carragenina, a co-administração de CPZ com CBD preveniu a resposta inflamatória, mas não a dor (Costa et al., 2004). Esses resultados aparentemente contraditórios na literatura podem ser atribuídos a diferenças metodológicas entre os estudos. Fatores como o modelo de dor específico utilizado, dosagem, momento da administração de CBD e capsazepina, e os métodos de avaliação empregados podem contribuir para variações nos efeitos observados.

O efeito analgésico da capsazepina é atribuído à sua capacidade de reduzir as correntes mediadas por TRPV1, que contribuem para a hiperexcitabilidade (McArthur et al., 2019). Por outro lado, o CBD ativa os canais TRPV1, mas com rápida dessensibilização, resultando no silenciamento dos neurônios hiperativos da dor e promoção da analgesia (Anand et al., 2020).

(Jeske et al., 2006), investigaram o mecanismo pelo qual os canabinoides, especificamente o composto WIN, age para desfosforilar e dessensibilizar a atividade do TRPV1. A principal descoberta do estudo é que o WIN induz a desfosforilação do TRPV1 em neurônios sensoriais do gânglio trigeminal, ativando o TRPA1 (receptor potencial transitório de anquirina 1), outro receptor envolvido na dor e na sinalização sensorial. Novamente, em um outro estudo utilizando análise de patch clamp conduzida em células HEK293 transfetadas, foi demonstrado que o CBD pode ativar e rapidamente dessensibilizar os canais TRPV1, TRPV2 e TRPA1 de forma dose-dependente (Iannotti et al., 2014). A desfosforilação do TRPV1 pode resultar em uma diminuição em sua atividade e responsividade. Esse processo pode levar à dessensibilização do receptor, onde se torna menos sensível ou responsivo a estímulos ativadores. Essa dessensibilização é considerada

responsável pelo efeito analgésico paradoxal dos agonistas do TRPV1 e pode explicar como a ativação do TRP pode reduzir a hiperexcitabilidade neuronal (Wong & Gavva, 2009).

Curiosamente, o envolvimento da fosforilação do TRPV1 pela proteína quinase C (PKC) no desenvolvimento da hiperalgesia inflamatória tem sido estudado (Gu et al., 2018). Pesquisas recentes utilizando edição de genes CriSPr/Cas9 para eliminar o local de fosforilação da PKC S801 no TRPV1 demonstraram uma redução na dor contínua associada à inflamação do músculo masseter, sem interferir nas funções fisiológicas normais do TRPV1 (Joseph et al., 2019). Essas descobertas sugerem o potencial para desenvolver novos antagonistas do TRPV1 que visam especificamente a forma fosforilada do TRPV1, abrindo novas possibilidades para estratégias direcionadas de controle da dor.

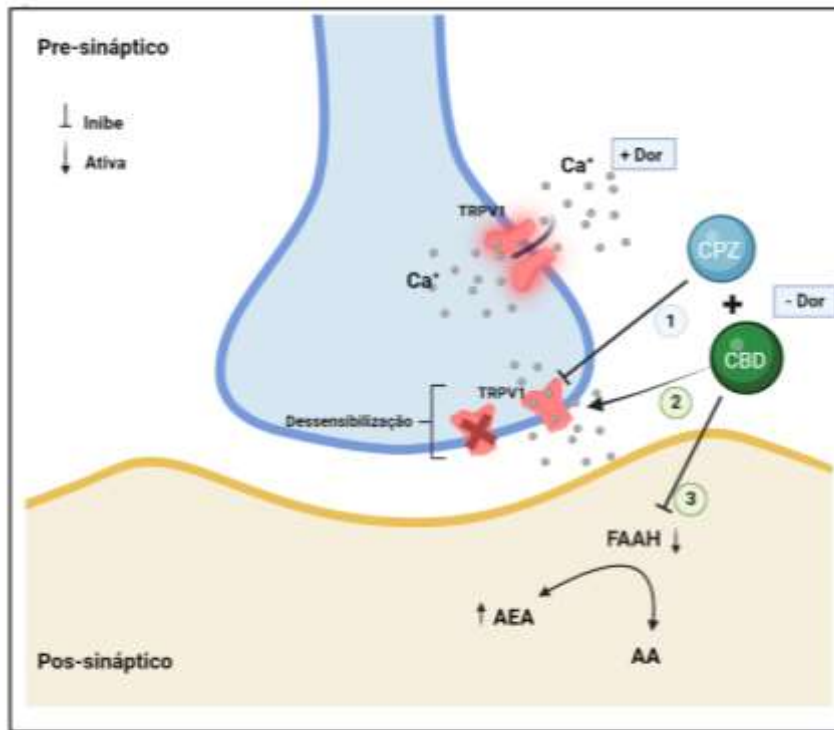
Por outro lado, o potencial efeito antinociceptivo da associação CPZ + CBD também pode ser explicado pela atuação diretamente no sistema endocanabinoide. O CBD atua como inibidor da enzima FAAH e ativa o receptor TRPV1 através da sua inibição. Essa enzima é responsável pela quebra e degradação de endocanabinoides, como a anandamida (AEA). A inibição da enzima evitaria essa quebra resultando no aumento de AEA, o que facilita seus efeitos analgésicos na dor neuropática (O’Hearn et al., 2017) (**Fig.15**). Uma revisão de Hossain e colaboradores (2020) mostrou que inibidores da FAAH apresentam efeitos antialodínicos e antihiperalgésicos potentes em modelos de dor neuropática em roedores (Hossain et al., 2020). Além disso, esse trabalho também demonstrou que os inibidores duais como (AA-5-HT) que é um composto híbrido que atua como inibidor da enzima FAAH e antagonista do canal TRPV1, foram testados em modelos de dor neuropática, mostrando que o composto AA-5-HT produziu resultados antinociceptivos melhores do que os inibidores destes receptores que foram testados em modelos de dor neuropática separadamente (de Novellis et al., 2011; Hossain et al., 2020; Malek et al., 2016; Malek & Starowicz, 2016). Em conjunto, estes dados indicam que a co-administração de um inibidor da FAAH e um antagonista do receptor TRPV1 resulta em uma resposta antinociceptiva.

Para obter uma compreensão dos mecanismos dos efeitos antinociceptivos dessa associação, também foi avaliada a expressão proteica do TRPV1 em Sp5c. O Western Blotting demonstrou que a expressão do TRPV1 aumentou consideravelmente no grupo de animais submetidos ao IoN-CCI. A associação de CBD e CPZ promoveu uma redução na expressão da proteína TRPV1 em Sp5c.

A capsazepina é descrita por modular a função e a expressão do TRPV1 em vários estudos. Alguns estudos relatam que o tratamento com capsazepina pode levar a uma redução nos níveis de proteína TRPV1. Kang e colaboradores (2021) mostram os efeitos do tratamento intratecal com capsazepina na expressão de TRPV1, por western blotting, em medula espinhal lombar de camundongos com inflamação induzida por carragenina. A expressão de TRPV1 na medula espinhal foi significativamente maior em animais injetados com carragenina e esta expressão foi reduzida em animais tratados com a capsazepina (Kang et al., 2021). Essa redução na expressão da proteína TRPV1 contribui para os efeitos analgésicos da capsazepina. Em modelo de dor neuropática induzida por quimioterápico também foi investigado o efeito da capsazepina intratecal sobre os níveis de TRPV1 em medula espinal. O aumento da intensidade de sinal por imunofluorescência dos receptores TRPV1 foi prevenido pela injeção de capsazepina (Lee et al., 2021). Vale ressaltar que, embora a capsazepina possa influenciar a expressão do TRPV1, seu mecanismo de ação primário é como um antagonista do TRPV1, inibindo a atividade dos canais TRPV1 em vez de afetar diretamente os níveis de expressão do TRPV1

A maioria das pesquisas sobre CBD e TRPV1, por outro lado, tem se concentrado em suas interações funcionais, em vez de mudanças na expressão do TRPV1. O CBD tem efeitos tanto ativadores quanto inibidores na atividade do TRPV1, dependendo da concentração e configuração experimental (Iannotti, Fabio Arturo et al 2014; Silva-Cardoso et al 2021)

**Fig. 15** – Desenho esquemático representando o mecanismo hipotético pelo qual CBD e CPZ reduzem a resposta nociceptiva no modelo de IoN-CCI.



**Fig. 15:** Representação da ação antinociceptiva sinérgica da combinação CPZ/CBD no sistema endocanabinoide e no receptor TRPV1 por meio dos seguintes mecanismos: 1. Bloqueio do receptor TRPV1 pelo antagonista CPZ, bloqueando sua atividade e impedindo que ele responda aos estímulos que desencadeiam a sensação de dor. 2. Ativação do receptor TRPV1 pelo CBD, levando à dessensibilização do receptor após uma exposição prolongada. 3. Inibição da enzima FAAH pelo CBD, aumentando o nível de AEA que é um endocanabinoide conhecido por seu papel na regulação da dor, dessensibilizando também TRPV1. Elaborado pelo próprio autor.

## **VI. CONCLUSÃO**

---

Como considerações finais acerca dos resultados deste estudo, podemos pontuar:

- ✓ Compostos canabinoides naturais e sintéticos têm um efeito antinociceptivo no modelo de neuralgia trigeminal (NT) em ratos, sem causar comprometimento da coordenação motora.
- ✓ A carbamazepina (CBZ), terapia padrão-ouro para NT apresentou efeito antinociceptivo acompanhado de prejuízo motor.
- ✓ A dose de 30 mg/kg de CBD alivia a alodinia mecânica, enquanto as doses de 3, 10 e 30 mg/kg de PECS-101 revertem efetivamente essa resposta. Utilizando as doses de 10 e 30 mg/kg, a CBZ atua melhorando a alodinia mecânica.
- ✓ As respostas de hiperalgia induzidas por IoN-CCI foram atenuadas tanto pelo CBD quanto pelo PECS-101 nas três doses testadas, enquanto apenas as doses de 10 e 30 mg/kg de CBZ reduzem essa resposta na segunda fase do teste de formalina.
- ✓ O tratamento com CBD e PECS-101 reduziu a expressão da proteína TRPV1 no subnúcleo caudal espinal do trigêmeo caudal (SP5c).
- ✓ A associação de Capsazepina (CPZ), um antagonista do TRPV1, com doses subefetivas de CBD foi altamente eficaz na redução da alodinia mecânica e da hiperalgia e reduziu a expressão da proteína TRPV1 no SP5c

A dor orofacial é uma condição altamente incapacitante que representa desafios significativos para a sociedade em termos sociais e econômicos. Diante da eficácia limitada e dos efeitos adversos significativos associados às terapias atuais, a necessidade de tratamentos mais eficazes para a dor orofacial é de extrema importância. Consolidar os achados de pesquisas sobre os canais TRP em relação à dor orofacial pode levar a uma compreensão mais profunda dessa doença debilitante e servir de base para o desenvolvimento racional de novos medicamentos analgésicos. Mais estudos pré-clínicos, incluindo avaliação de outras respostas hipernociceptivas, são necessários para entender melhor os benefícios e riscos potenciais dessa terapia combinada. Além disso, ensaios clínicos envolvendo seres humanos seriam necessários para avaliar sua eficácia em um contexto translacional.

## **VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

- Abbas, M. A. (2020). Modulation of TRPV1 channel function by natural products in the treatment of pain. *Chem Biol Interact*, 330, 109178. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.109178>
- Adamson Barnes, N. S., Mitchell, V. A., Kazantzis, N. P., & Vaughan, C. W. (2016). Actions of the dual FAAH/MAGL inhibitor JZL195 in a murine neuropathic pain model. *British Journal of Pharmacology*, 173(1), 77-87.
- Agarwal, N., Pacher, P., Tegeder, I., Amaya, F., Constantin, C. E., Brenner, G. J., . . . Monory, K. (2007). Cannabinoids mediate analgesia largely via peripheral type 1 cannabinoid receptors in nociceptors. *Nature neuroscience*, 10(7), 870-879.
- Agurell, S., Carlsson, S., Lindgren, J. E., Ohlsson, A., Gillespie, H., & Hollister, L. (1981). Interactions of  $\Delta^1$ -tetrahydrocannabinol with cannabinal and cannabidiol following oral administration in man. Assay of cannabinal and cannabidiol by mass fragmentography with cannabinal and cannabidiol following oral administration in man. Assay of cannabinal and cannabidiol by mass fragmentography. *Experientia*, 37, 1090-1092.
- Akhter, F., Haque, T., Sato, F., Kato, T., Ohara, H., Fujio, T., . . . Yoshida, A. (2014). Projections from the dorsal peduncular cortex to the trigeminal subnucleus caudalis (medullary dorsal horn) and other lower brainstem areas in rats. *Neuroscience*, 266, 23-37.
- Akopian, A. N., Ruparel, N. B., Jeske, N. A., Patwardhan, A., & Hargreaves, K. M. (2009). Role of ionotropic cannabinoid receptors in peripheral antinociception and antihyperalgesia. *Trends in pharmacological sciences*, 30(2), 79-84.
- Alelwani, W., Elmorsy, E., Kattan, S. W., Babteen, N. A., Alnajeebi, A. M., Al-Ghafari, A., & Carter, W. G. (2020). Carbamazepine induces a bioenergetics disruption to microvascular endothelial cells from the blood-brain barrier. *Toxicology Letters*, 333, 184-191.
- Anand, P., Privitera, R., Donatien, P., Fadavi, H., Tesfaye, S., Bravis, V., & Misra, V. P. (2022). Reversing painful and non-painful diabetic neuropathy with the capsaicin 8% patch: Clinical evidence for pain relief and restoration of function via nerve fiber regeneration. *Frontiers in Neurology*, 13, 998904.
- Anand, U., Jones, B., Korchev, Y., Bloom, S. R., Pacchetti, B., Anand, P., & Sodergren, M. H. (2020). CBD effects on TRPV1 signaling pathways in cultured DRG neurons. *Journal of Pain Research*, 2269-2278.
- Araya, I. E., Claudino, F. R., Piovesan, J. E., & Chichorro, G. J. (2020). Trigeminal Neuralgia: Basic and Clinical Aspects. *Current Neuropharmacology*, 18(2), 109-119. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.2174/1570159X17666191010094350>
- Bendtsen, L., Zakrzewska, J. M., Heinskou, T. B., Hodaie, M., Leal, P. R. L., Nurmiikko, T., . . . Maarbjerg, S. (2020). Advances in diagnosis, classification, pathophysiology, and management of trigeminal neuralgia. *The Lancet Neurology*, 19(9), 784-796.
- Bergouignan, M. (1958). [Fifteen years of trial therapy of essential trigeminal neuralgia: the place of diphenylhydantoin and its derivatives]. *Rev Neurol (Paris)*, 98(5), 414-416. (Quinze ans d'essais thérapeutiques dans la névralgie essentielle du trijumeau: la place de la diphénylhydantoïne et de ses dérivés.)
- Besson, J. M. (1997). The complexity of physiopharmacological aspects of pain. *Drugs*, 53, 1-9.
- Bisogno, T., Hanus, L., De Petrocellis, L., Tchilibon, S., Ponde, D. E., Brandi, I., . . . Di Marzo, V. (2001). Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. *Br J Pharmacol*, 134(4), 845-852. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704327>
- Bista, P., & Imlach, W. L. (2019). Pathological mechanisms and therapeutic targets for trigeminal neuropathic pain. *Medicines*, 6(3), 91.
- Breuer, A., Haj, C. G., Fogaça, M. V., Gomes, F. V., Silva, N. R., Pedrazzi, J. F., . . . Zuardi, A. W. (2016). Fluorinated cannabidiol derivatives: enhancement of activity in mice models predictive of anxiolytic, antidepressant and antipsychotic effects. *PLoS One*, 11(7), e0158779.
- Campos, A. C., & Guimarães, F. S. (2009). Evidence for a potential role for TRPV1 receptors in the dorsolateral periaqueductal gray in the attenuation of the anxiolytic effects of cannabinoids. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 33(8), 1517-1521. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2009.08.017>



- Campos, A. C., Moreira, F. A., Gomes, F. V., Del Bel, E. A., & Guimarães, F. S. (2012). Multiple mechanisms involved in the large-spectrum therapeutic potential of cannabidiol in psychiatric disorders. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, *367*(1607), 3364-3378. <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0389>
- Caterina, M. J., Leffler, A., Malmberg, A. B., Martin, W. J., Trafton, J., Petersen-Zeitz, K. R., . . . Julius, D. (2000). Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science*, *288*(5464), 306-313. <https://doi.org/10.1126/science.288.5464.306>
- Caterina, M. J., Schumacher, M. A., Tominaga, M., Rosen, T. A., Levine, J. D., & Julius, D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, *389*(6653), 816-824. <https://doi.org/10.1038/39807>
- Chen, Q., & Heinricher, M. M. (2022). Shifting the balance: how top-down and bottom-up input modulate pain via the rostral ventromedial medulla. *Frontiers in Pain Research*, *3*, 932476.
- Clavelou, P., Dallel, R., Orliaguet, T., Woda, A., & Raboisson, P. (1995). The orofacial formalin test in rats: effects of different formalin concentrations. *Pain*, *62*(3), 295-301. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0304-3959\(94\)00273-H](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0304-3959(94)00273-H)
- Costa, B., Bettoni, I., Petrosino, S., Comelli, F., Giagnoni, G., & Di Marzo, V. (2010). The dual fatty acid amide hydrolase/TRPV1 blocker, N-arachidonoyl-serotonin, relieves carrageenan-induced inflammation and hyperalgesia in mice. *Pharmacological Research*, *61*(6), 537-546. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.phrs.2010.02.001>
- Costa, B., Comelli, F., Bettoni, I., Colleoni, M., & Giagnoni, G. (2008). The endogenous fatty acid amide, palmitoylethanolamide, has anti-allodynic and anti-hyperalgesic effects in a murine model of neuropathic pain: involvement of CB(1), TRPV1 and PPARgamma receptors and neurotrophic factors. *Pain*, *139*(3), 541-550. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2008.06.003>
- Costa, B., Giagnoni, G., Franke, C., Trovato, A. E., & Colleoni, M. (2004). Vanilloid TRPV1 receptor mediates the antihyperalgesic effect of the nonpsychoactive cannabinoid, cannabidiol, in a rat model of acute inflammation. *Br J Pharmacol*, *143*(2), 247-250. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705920>
- Costa, B., Trovato, A. E., Comelli, F., Giagnoni, G., & Colleoni, M. (2007). The non-psychoactive cannabis constituent cannabidiol is an orally effective therapeutic agent in rat chronic inflammatory and neuropathic pain. *European Journal of Pharmacology*, *556*(1), 75-83. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.11.006>
- Crescente, G., Minervini, G., Spagnuolo, C., & Moccia, S. (2022). Cannabis bioactive compound-based formulations: new perspectives for the management of orofacial pain. *Molecules*, *28*(1), 106.
- Cristino, L., Bisogno, T., & Di Marzo, V. (2020). Cannabinoids and the expanded endocannabinoid system in neurological disorders. *Nature Reviews Neurology*, *16*(1), 9-29.
- Crivelaro do Nascimento, G., Ferrari, D. P., Guimaraes, F. S., Del Bel, E. A., Bortolanza, M., & Ferreira-Junior, N. C. (2020). Cannabidiol increases the nociceptive threshold in a preclinical model of Parkinson's disease. *Neuropharmacology*, *163*, 107808. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.107808>
- Davis, J. B., Gray, J., Gunthorpe, M. J., Hatcher, J. P., Davey, P. T., Overend, P., . . . Sheardown, S. A. (2000). Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature*, *405*(6783), 183-187. <https://doi.org/10.1038/35012076>
- De Gregorio, D., McLaughlin, R. J., Posa, L., Ochoa-Sanchez, R., Enns, J., Lopez-Canul, M., . . . Gobbi, G. (2019). Cannabidiol modulates serotonergic transmission and reverses both allodynia and anxiety-like behavior in a model of neuropathic pain. *Pain*, *160*(1), 136-150. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001386>
- de Novellis, V., Vita, D., Gatta, L., Luongo, L., Bellini, G., De Chiaro, M., . . . Piscitelli, F. (2011). The blockade of the transient receptor potential vanilloid type 1 and fatty acid amide hydrolase decreases symptoms and central sequelae in the medial prefrontal cortex of neuropathic rats. *Molecular pain*, *7*, 1744-8069.
- Debnath, S., Raju, J. M., & Chennapragada, R. S. (2020). Carbamazepine and its Synthesis Related Impurities Profile Compilation and its Monograph Dispute for the Best Regulatory Practice: A Review. *Journal of Young Pharmacists*, *12*(4), 294.
- Demartini, C., Greco, R., Zanaboni, A. M., Francesconi, O., Nativi, C., Tassorelli, C., & Deseure, K. (2018). Antagonism of transient receptor potential ankyrin type-1 channels as a potential target for the

- treatment of trigeminal neuropathic pain: study in an animal model. *International journal of molecular sciences*, 19(11), 3320.
- Deseure, K., & Hans, G. H. (2015). Chronic constriction injury of the rat's infraorbital nerve (IoN-CCI) to study trigeminal neuropathic pain. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*(103), e53167.
- Di Cesare Mannelli, L., D'Agostino, G., Pacini, A., Russo, R., Zanardelli, M., Ghelardini, C., & Calignano, A. (2013). Palmitoylethanolamide is a disease-modifying agent in peripheral neuropathy: pain relief and neuroprotection share a PPAR- $\alpha$ -mediated mechanism. *Mediators of Inflammation*, 2013.
- Ding, W., You, Z., Shen, S., Yang, J., Lim, G., Doheny, J. T., . . . Mao, J. (2017). An improved rodent model of trigeminal neuropathic pain by unilateral chronic constriction injury of distal infraorbital nerve. *The Journal of Pain*, 18(8), 899-907.
- dos-Santos-Pereira, M., Acuña, L., Hamadat, S., Rocca, J., González-Lizárraga, F., Chehín, R., . . . Michel, P. P. (2018). Microglial glutamate release evoked by  $\alpha$ -synuclein aggregates is prevented by dopamine. *Glia*, 66(11), 2353-2365.
- Dubuisson, D., & Dennis, S. G. (1977). The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain*, 4(2), 161-174. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(77\)90130-0](https://doi.org/10.1016/0304-3959(77)90130-0)
- Eboli, P., Stone, J. L., Aydin, S., & Slavin, K. V. (2009). HISTORICAL CHARACTERIZATION OF TRIGEMINAL NEURALGIA. *Neurosurgery*, 64(6).
- Elmorsy, E. M. (2020). Carbamazepine induces oxidative stress on rats' microvascular endothelial cells of the blood-brain barrier. *Ann. Clin. Anal. Med.*, 11, 231-234.
- Etemad, L., Karimi, G., Alavi, M. S., & Roohbakhsh, A. (2022). Pharmacological effects of cannabidiol by transient receptor potential channels. *Life Sci*, 300, 120582. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120582>
- Fiani, B., Sarhadi, K. J., Soula, M., Zafar, A., & Quadri, S. A. (2020). Current application of cannabidiol (CBD) in the management and treatment of neurological disorders. *Neurological Sciences*, 41, 3085-3098.
- Finn, D. P., Haroutounian, S., Hohmann, A. G., Krane, E., Soliman, N., & Rice, A. S. C. (2021). Cannabinoids, the endocannabinoid system and pain: a review of preclinical studies. *Pain*, 162(Suppl 1), S5.
- Fu, J., Mu, G., Qiu, L., Zhao, J., & Ou, C. (2020). c-Abl-p38  $\alpha$  signaling pathway mediates dopamine neuron loss in trigeminal neuralgia. *Molecular pain*, 16, 1744806920930855.
- Gallily, R., & Yekhtin, Z. (2019). Avidekel Cannabis extracts and cannabidiol are as efficient as Copaxone in suppressing EAE in SJL/J mice. *Inflammopharmacology*, 27, 167-173.
- Gambeta, E., Chichorro, J. G., & Zamponi, G. W. (2020). Trigeminal neuralgia: An overview from pathophysiology to pharmacological treatments. *Molecular pain*, 16, 1744806920901890.
- Giorgio, L., Joanna, Z., & Manjit, M. (2021). Trigeminal neuralgia: a practical guide. *Practical Neurology*, 21(5), 392. <https://doi.org/10.1136/practneurol-2020-002782>
- Greco, R., Francavilla, M., Demartini, C., Zanaboni, A. M., Sodergren, M. H., Facchetti, S., . . . Tassorelli, C. (2023). Characterization of the biochemical and behavioral effects of cannabidiol: implications for migraine. *The journal of headache and pain*, 24(1), 1-15.
- Gu, Y., Li, G., & Huang, L.-Y. M. (2018). Inflammation induces Epac-protein kinase C alpha and epsilon signaling in TRPV1-mediated hyperalgesia. *Pain*, 159(11), 2383-2393.
- Gupta, S., Bansal, R. N., Singh Sodhi, S. P., & Brar, G. K. (2022). Animal models - Mimicking the pain of trigeminal neuralgia. *Indian J Pharmacol*, 54(2), 138-145. [https://doi.org/10.4103/ijp.ijp.296\\_19](https://doi.org/10.4103/ijp.ijp.296_19)
- Hardt, S., Fischer, C., Vogel, A., Wilken-Schmitz, A., & Tegeder, I. (2019). Distal infraorbital nerve injury: a model for persistent facial pain in mice. *PAIN*, 160(6).
- Holson, R. R. (1992). Euthanasia by decapitation: evidence that this technique produces prompt, painless unconsciousness in laboratory rodents. *Neurotoxicol Teratol*, 14(4), 253-257. [https://doi.org/10.1016/0892-0362\(92\)90004-t](https://doi.org/10.1016/0892-0362(92)90004-t)
- Hossain, M. Z., Ando, H., Unno, S., & Kitagawa, J. (2020). Targeting Peripherally Restricted Cannabinoid Receptor 1, Cannabinoid Receptor 2, and Endocannabinoid-Degrading Enzymes for the Treatment of Neuropathic Pain Including Neuropathic Orofacial Pain. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(4).
- Iannotti, F. A., Hill, C. L., Leo, A., Alhusaini, A., Soubrane, C., Mazzeella, E., . . . Stephens, G. J. (2014). Nonpsychotropic plant cannabinoids, cannabidivarin (CBDV) and cannabidiol (CBD), activate and

- desensitize transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) channels in vitro: potential for the treatment of neuronal hyperexcitability. *ACS Chem Neurosci*, 5(11), 1131-1141. <https://doi.org/10.1021/cn5000524>
- Idänpään-Heikkilä, J. J., & Guilbaud, G. (1999). Pharmacological studies on a rat model of trigeminal neuropathic pain: baclofen, but not carbamazepine, morphine or tricyclic antidepressants, attenuates the allodynia-like behaviour. *Pain*, 79(2-3), 281-290. [https://doi.org/10.1016/s0304-3959\(98\)00172-9](https://doi.org/10.1016/s0304-3959(98)00172-9)
- Iwata, K., Takeda, M., Oh, S. B., & Shinoda, M. (2017). Neurophysiology of orofacial pain. *Contemporary Oral Medicine, Springer International Publishing*, 1-23.
- Jara-Oseguera, A., Simon, S. A., & Rosenbaum, T. (2008). TRPV1: on the road to pain relief. *Curr Mol Pharmacol*, 1(3), 255-269. <https://doi.org/10.2174/1874467210801030255>
- Jeon, H. J., Han, S. R., Park, M. K., Yang, K. Y., Bae, Y. C., & Ahn, D. K. (2012). A novel trigeminal neuropathic pain model: compression of the trigeminal nerve root produces prolonged nociception in rats. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 38(2), 149-158.
- Jeske, N. A., Patwardhan, A. M., Gamper, N., Price, T. J., Akopian, A. N., & Hargreaves, K. M. (2006). Cannabinoid WIN 55,212-2 regulates TRPV1 phosphorylation in sensory neurons. *Journal of Biological Chemistry*, 281(43), 32879-32890.
- Jessri, M., Sultan, A. S., Tavares, T., & Schug, S. (2020). Central mechanisms of pain in orofacial pain patients: implications for management. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 49(6), 476-483.
- Jesus, C. H. A., Ferreira, M. V., Gasparin, A. T., Rosa, E. S., Genaro, K., de Souza Crippa, J. A., . . . da Cunha, J. M. (2022). Cannabidiol enhances the antinociceptive effects of morphine and attenuates opioid-induced tolerance in the chronic constriction injury model. *Behavioural Brain Research*, 435, 114076.
- Jian-Xiong, A., Wan-Rui, S., Jian-Feng, Z., Xiao-Yan, Q., Qi-Wu, F., Wang, Y., & Williams, J. P. (2019). A new rat model of thalamic pain produced by administration of cobra venom to the unilateral ventral posterolateral nucleus. *Pain Physician*, 22(6), E635.
- Jin, F., Wen, Y., Lin, G., Yu, S., Wang, C., Ye, W., & Zhang, J. (2023). Design, synthesis, and analgesia evaluation of novel Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1) agonists modified from Cannabidiol (CBD). *Bioorg Med Chem*, 90, 117379. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2023.117379>
- Joseph, J., Qu, L., Wang, S., Kim, M., Bennett, D., Ro, J., . . . Chung, M.-K. (2019). Phosphorylation of TRPV1 S801 contributes to modality-specific hyperalgesia in mice. *Journal of Neuroscience*, 39(50), 9954-9966.
- Kang, S.-Y., Seo, S. Y., Bang, S. K., Cho, S. J., Choi, K.-H., & Ryu, Y. (2021). Inhibition of spinal TRPV1 reduces NMDA receptor 2B phosphorylation and produces anti-nociceptive effects in mice with inflammatory pain. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(20), 11177.
- Kawamura, S. (1971). Efferent projections of the nucleus caudalis of the spinal trigeminal complex in the cat. *Okajimas Folia Anatomica Japonica*, 47(6), 377-405.
- Keeble, J., Russell, F., Curtis, B., Starr, A., Pinter, E., & Brain, S. D. (2005). Involvement of transient receptor potential vanilloid 1 in the vascular and hyperalgesic components of joint inflammation. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*, 52(10), 3248-3256.
- Khalid, W. A.-Q. (2015). Update on neuropathic pain treatment for trigeminal neuralgia. *Neurosciences Journal*, 20(2), 107. <https://doi.org/10.17712/nsj.2015.2.20140501>
- Kim, Y. S., Chu, Y., Han, L., Li, M., Li, Z., LaVinka, P. C., . . . Caterina, M. J. (2014). Central terminal sensitization of TRPV1 by descending serotonergic facilitation modulates chronic pain. *Neuron*, 81(4), 873-887.
- Klaumann, P. R., Wouk, A., & Sillas, T. (2008). Pathophysiology of pain. *Archives of veterinary Science*, 13(1).
- Koivisto, A.-P., Belvisi, M. G., Gaudet, R., & Szallasi, A. (2022). Advances in TRP channel drug discovery: from target validation to clinical studies. *Nature reviews Drug discovery*, 21(1), 41-59.
- Korczyńska, O. A., Katzmann Rider, G., Gajra, S., Narra, V., Ramavajla, V., Chang, Y. J., . . . Khan, J. (2020). Differential gene expression changes in the dorsal root versus trigeminal ganglia following peripheral nerve injury in rats. *European journal of pain*, 24(5), 967-982.
- Krzyżanowska, A., Pittolo, S., Cabrerizo, M., Sánchez-López, J., Krishnasamy, S., Venero, C., & Avendaño, C. (2011). Assessing nociceptive sensitivity in mouse models of inflammatory and neuropathic trigeminal pain. *Journal of neuroscience methods*, 201(1), 46-54.

- Kumar, S., Rastogi, S., Mahendra, P., Bansal, M., & Chandra, L. (2013). Pain in trigeminal neuralgia: neurophysiology and measurement: a comprehensive review. *J Med Life*, *6*(4), 383-388.
- Lee, J. H., Ji, H., Ko, S.-G., & Kim, W. (2021). Ji017 attenuates oxaliplatin-induced cold allodynia via spinal trpv1 and astrocytes inhibition in mice. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(16), 8811.
- Leite-Panissi, C. R. A., De Paula, B. B., Neubert, J. K., & Caudle, R. M. (2023). Influence of TRPV1 on Thermal Nociception in Rats with Temporomandibular Joint Persistent Inflammation Evaluated by the Operant Orofacial Pain Assessment Device (OPAD). *J Pain Res*, *16*, 2047-2062. <https://doi.org/10.2147/jpr.s405258>
- Liang, Y. C., Huang, C. C., & Hsu, K. S. (2007). The synthetic cannabinoids attenuate allodynia and hyperalgesia in a rat model of trigeminal neuropathic pain. *Neuropharmacology*, *53*(1), 169-177. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2007.04.019>
- Louis-Gray, K., Tupal, S., & Premkumar, L. S. (2022). TRPV1: A Common Denominator Mediating Antinociceptive and Antiemetic Effects of Cannabinoids. *Int J Mol Sci*, *23*(17). <https://doi.org/10.3390/ijms231710016>
- Luo, D.-S., Zhang, T., Chang-Xu, Z., Zuo, Z.-F., Li, H., Sheng-Xi, W., . . . Yun-Qing, L. (2012). An animal model for trigeminal neuralgia by compression of the trigeminal nerve root. *Pain physician*, *15*(2), 187.
- Luo, L., Wang, Y., Li, B., Xu, L., Kamau, P. M., Zheng, J., . . . Lai, R. (2019). Molecular basis for heat desensitization of TRPV1 ion channels. *Nature communications*, *10*(1), 2134.
- Luo, Y., Suttle, A., Zhang, Q., Wang, P., & Chen, Y. (2021). Transient Receptor Potential (TRP) Ion Channels in Orofacial Pain. *Mol Neurobiol*, *58*(6), 2836-2850. <https://doi.org/10.1007/s12035-021-02284-2>
- Maarbjerg, S., Di Stefano, G., Bendtsen, L., & Cruccu, G. (2017). Trigeminal neuralgia—diagnosis and treatment. *Cephalalgia*, *37*(7), 648-657.
- Malek, N., Kostrzewa, M., Makuch, W., Pajak, A., Kucharczyk, M., Piscitelli, F., . . . Starowicz, K. (2016). The multiplicity of spinal AA-5-HT anti-nociceptive action in a rat model of neuropathic pain. *Pharmacological research*, *111*, 251-263.
- Malek, N., & Starowicz, K. (2016). Dual-acting compounds targeting endocannabinoid and endovanilloid systems—a novel treatment option for chronic pain management. *Frontiers in Pharmacology*, *7*, 257.
- Mallick-Searle, T., & Marie, B. S. (2019). Cannabinoids in pain treatment: An overview. *Pain management nursing*, *20*(2), 107-112.
- McArthur, J. R., Finol-Urdaneta, R. K., & Adams, D. J. (2019). Analgesic transient receptor potential vanilloid-1-active compounds inhibit native and recombinant T-type calcium channels. *Br J Pharmacol*, *176*(13), 2264-2278. <https://doi.org/10.1111/bph.14676>
- McDonough, P., McKenna, J. P., McCreary, C., & Downer, E. J. (2014). Neuropathic orofacial pain: Cannabinoids as a therapeutic avenue. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *55*, 72-78. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biocel.2014.08.007>
- Mlost, J., Bryk, M., & Starowicz, K. (2020). Cannabidiol for Pain Treatment: Focus on Pharmacology and Mechanism of Action. *Int J Mol Sci*, *21*(22). <https://doi.org/10.3390/ijms21228870>
- Montero, A. A., & Carnerero, C. I. S. (2018). Papel de los bloqueadores de los canales de sodio dependientes de voltaje en el tratamiento del dolor crónico: usos potenciales en la práctica clínica según la evidencia disponible. *Revista Española de Anestesiología y Reanimación*, *65*(5), 275-283.
- Morales, P., Reggio, P. H., & Jagerovic, N. (2017). An overview on medicinal chemistry of synthetic and natural derivatives of cannabidiol. *Frontiers in pharmacology*, *8*, 422.
- Moran, M. M., & Szallasi, A. (2018). Targeting nociceptive transient receptor potential channels to treat chronic pain: current state of the field. *Br J Pharmacol*, *175*(12), 2185-2203. <https://doi.org/10.1111/bph.14044>
- Nakajima, Y., Furuichi, Y., Biswas, K. K., Hashiguchi, T., Kawahara, K., Yamaji, K., . . . Maruyama, I. (2006). Endocannabinoid, anandamide in gingival tissue regulates the periodontal inflammation through NF-kappaB pathway inhibition. *FEBS Lett*, *580*(2), 613-619. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.12.079>
- Navarro, G., Reyes-Resina, I., Rivas-Santisteban, R., Sánchez de Medina, V., Morales, P., Casano, S., . . . Franco, R. (2018). Cannabidiol skews biased agonism at cannabinoid CB(1) and CB(2) receptors with smaller effect in CB(1)-CB(2) heteroreceptor complexes. *Biochem Pharmacol*, *157*, 148-158. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.08.046>

- Ni, H., Wang, Y., Chen, X., & Gu, W. (2020). Outcomes of Treatment for Elderly Patients With Trigeminal Neuralgia: Percutaneous Balloon Compression Versus Microvascular Decompression. *Journal of Craniofacial Surgery*, 31(7).
- Nisbet, G., & Sehgal, A. (2019). Pharmacology in the management of chronic pain. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*, 20(10), 555-558.
- Novakova-Tousova, K., Vyklicky, L., Susankova, K., Benedikt, J., Samad, A., Teisinger, J., & Vlachova, V. (2007). Functional changes in the vanilloid receptor subtype 1 channel during and after acute desensitization. *Neuroscience*, 149(1), 144-154. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.07.039>
- Osuntokun, O. S., Abdulwahab, U. F., Akanji, N. O., Adedokun, K. I., Adekomi, A. D., & Olayiwola, G. (2021). Anticonvulsant and neuroprotective effects of carbamazepine-levetiracetam adjunctive treatment in convulsive status epilepticus rat model: Inhibition of cholinergic transmission. *Neurosci Lett*, 762, 136167. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2021.136167>
- O'Hearn, S., Diaz, P., Wan, B. A., DeAngelis, C., Lao, N., Malek, L., . . . Blake, A. (2017). Modulating the endocannabinoid pathway as treatment for peripheral neuropathic pain: a selected review of preclinical studies. *Ann Palliat Med*, 6(Suppl 2), S209-S214.
- Park, B. K., Kitteringham, N. R., & O'Neill, P. M. (2001). Metabolism of fluorine-containing drugs. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 41(1), 443-470.
- Peng, J., Fan, M., An, C., Ni, F., Huang, W., & Luo, J. (2022). A narrative review of molecular mechanism and therapeutic effect of cannabidiol (CBD). *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 130(4), 439-456.
- Perez, M., Cartarozzi, L. P., Chiarotto, G. B., de Oliveira, S. A., Guimarães, F. S., & de Oliveira, A. L. R. (2018). Neuronal preservation and reactive gliosis attenuation following neonatal sciatic nerve axotomy by a fluorinated cannabidiol derivative. *Neuropharmacology*, 140, 201-208.
- Pineda-Farias, J. B., Loeza-Alcocer, E., Nagarajan, V., Gold, M. S., & Sekula, R. F., Jr. (2021). Mechanisms Underlying the Selective Therapeutic Efficacy of Carbamazepine for Attenuation of Trigeminal Nerve Injury Pain. *J Neurosci*, 41(43), 8991-9007. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.0547-21.2021>
- Piomelli, D. (2005). The endocannabinoid system: a drug discovery perspective. *Current opinion in investigational drugs (London, England: 2000)*, 6(7), 672-679.
- Prasad, S., & Galetta, S. (2009). Trigeminal Neuralgia: Historical Notes and Current Concepts. *The Neurologist*, 15(2).
- Rahn, E. J., & Hohmann, A. G. (2009). Cannabinoids as pharmacotherapies for neuropathic pain: from the bench to the bedside. *Neurotherapeutics*, 6(4), 713-737.
- Reddy, D. S. (2023). Therapeutic and clinical foundations of cannabidiol therapy for difficult-to-treat seizures in children and adults with refractory epilepsies. *Experimental Neurology*, 359, 114237.
- Ross, R. A. (2003). Anandamide and vanilloid TRPV1 receptors. *British journal of pharmacology*, 140(5), 790-801.
- Rossi, H. L., Jenkins, A. C., Kaufman, J., Bhattacharyya, I., Caudle, R. M., & Neubert, J. K. (2012). Characterization of bilateral trigeminal constriction injury using an operant facial pain assay. *Neuroscience*, 224, 294-306.
- Rotpenpian, N., & Yakkaphan, P. (2021). Review of literatures: Physiology of orofacial pain in dentistry. *eneuro*, 8(2).
- Sanz-Salvador, L., Andrés-Borderia, A., Ferrer-Montiel, A., & Planells-Cases, R. (2012). Agonist- and Ca<sup>2+</sup>-dependent desensitization of TRPV1 channel targets the receptor to lysosomes for degradation. *J Biol Chem*, 287(23), 19462-19471. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.289751>
- Schlosburg, J. E., Blankman, J. L., Long, J. Z., Nomura, D. K., Pan, B., Kinsey, S. G., . . . Burston, J. J. (2010). Chronic monoacylglycerol lipase blockade causes functional antagonism of the endocannabinoid system. *Nature neuroscience*, 13(9), 1113-1119.
- Schwarz, A., Strakos, C., & Weihrich, R. (2021). A brief review on carbamazepine: history, pharmacological properties and environmental impact.
- Silva, N. R., Gomes, F. I. F., Lopes, A. H. P., Cortez, I. L., Dos Santos, J. C., Silva, C. E. A., . . . Guimarães, F. S. (2022). The cannabidiol analog PECS-101 prevents chemotherapy-induced neuropathic pain via PPAR $\gamma$  receptors. *Neurotherapeutics*, 19(1), 434-449.

- Silva, N. R., Gomes, F. V., Fonseca, M. D., Mechoulam, R., Breuer, A., Cunha, T. M., & Guimaraes, F. S. (2017). Antinociceptive effects of HUF-101, a fluorinated cannabidiol derivative. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *79*, 369-377.
- Silva-Cardoso, G. K., Lazarini-Lopes, W., Hallak, J. E., Crippa, J. A., Zuardi, A. W., Garcia-Cairasco, N., & Leite-Panissi, C. R. A. (2021). Cannabidiol effectively reverses mechanical and thermal allodynia, hyperalgesia, and anxious behaviors in a neuropathic pain model: Possible role of CB1 and TRPV1 receptors. *Neuropharmacology*, *197*, 108712. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2021.108712>
- Silvestro, S., Schepici, G., Bramanti, P., & Mazzon, E. (2020). Molecular Targets of Cannabidiol in Experimental Models of Neurological Disease. *Molecules*, *25*(21). <https://doi.org/10.3390/molecules25215186>
- Sonego, A. B., Prado, D. S., Vale, G. T., Sepulveda-Diaz, J. E., Cunha, T. M., Tirapelli, C. R., . . . Guimarães, F. S. (2018). Cannabidiol prevents haloperidol-induced vacuos chewing movements and inflammatory changes in mice via PPAR $\gamma$  receptors. *Brain, behavior, and immunity*, *74*, 241-251.
- Spiller, H. A. (2001). Management of carbamazepine overdose. *Pediatric Emergency Care*, *17*(6).
- Szabo, A., Helyes, Z., Sandor, K., Bite, A., Pinter, E., Nemeth, J., . . . Szolcsanyi, J. (2005). Role of transient receptor potential vanilloid 1 receptors in adjuvant-induced chronic arthritis: in vivo study using gene-deficient mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *314*(1), 111-119.
- Szallasi, A., Cortright, D. N., Blum, C. A., & Eid, S. R. (2007). The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept. *Nat Rev Drug Discov*, *6*(5), 357-372. <https://doi.org/10.1038/nrd2280>
- Tamada, M., Ohi, Y., Kodama, D., Miyazawa, K., Goto, S., & Haji, A. (2021). Modulation of excitatory synaptic transmissions by TRPV1 in the spinal trigeminal subnucleus caudalis neurons of neuropathic pain rats. *European journal of pharmacology*, *913*, 174625.
- Tjølsen, A., Berge, O. G., Hunskaar, S., Rosland, J. H., & Hole, K. (1992). The formalin test: an evaluation of the method. *Pain*, *51*(1), 5-17. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(92\)90003-t](https://doi.org/10.1016/0304-3959(92)90003-t)
- Trevisan, G., Benemei, S., Materazzi, S., De Logu, F., De Siena, G., Fusi, C., . . . Nassini, R. (2016). TRPA1 mediates trigeminal neuropathic pain in mice downstream of monocytes/macrophages and oxidative stress. *Brain*, *139*(5), 1361-1377. <https://doi.org/10.1093/brain/aww038>
- Urano, H., Ara, T., Fujinami, Y., & Hiraoka, B. Y. (2012). Aberrant TRPV1 expression in heat hyperalgesia associated with trigeminal neuropathic pain. *Int J Med Sci*, *9*(8), 690-697. <https://doi.org/10.7150/ijms.4706>
- Urits, I., Gress, K., Charipova, K., Habib, K., Lee, D., Lee, C., . . . Paladini, A. (2020). Use of cannabidiol (CBD) for the treatment of chronic pain. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology*, *34*(3), 463-477.
- van Rijn, C. M., Krijnen, H., Menting-Hermeling, S., & Coenen, A. M. (2011). Decapitation in rats: latency to unconsciousness and the 'wave of death'. *PLoS One*, *6*(1), e16514. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016514>
- Vivanco-Estela, A. N., dos-Santos-Pereira, M., Guimaraes, F. S., Del-Bel, E., & Nascimento, G. C. d. (2021). Cannabidiol has therapeutic potential for myofascial pain in female and male parkinsonian rats. *Neuropharmacology*, *196*, 108700. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2021.108700>
- Vos, B. P., Strassman, A. M., & Maciewicz, R. J. (1994). Behavioral evidence of trigeminal neuropathic pain following chronic constriction injury to the rat's infraorbital nerve. *J Neurosci*, *14*(5 Pt 1), 2708-2723. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.14-05-02708.1994>
- Vučković, S., Srebro, D., Vujović, K. S., Vučetić, Č., & Prostran, M. (2018). Cannabinoids and pain: new insights from old molecules. *Frontiers in pharmacology*, *9*, 1259.
- Vyklický, L., Novakova-Tousova, K., Benedikt, J., Samad, A., Touska, F., & Vlachová, V. (2008). Calcium-dependent desensitization of vanilloid receptor TRPV1: a mechanism possibly involved in analgesia induced by topical application of capsaicin. *Physiol Res*, *57*(Suppl 3), S59-68.
- Walker, J. M., & Huang, S. M. (2002). Endocannabinoids in pain modulation. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)*, *66*(2-3), 235-242.
- Wang, S., Bian, C., Yang, J., Arora, V., Gao, Y., Wei, F., & Chung, M. K. (2020). Ablation of TRPV1+ Afferent Terminals by Capsaicin Mediates Long-Lasting Analgesia for Trigeminal Neuropathic Pain. *eNeuro*, *7*(3). <https://doi.org/10.1523/eneuro.0118-20.2020>

- Wong, G. Y., & Gavva, N. R. (2009). Therapeutic potential of vanilloid receptor TRPV1 agonists and antagonists as analgesics: Recent advances and setbacks. *Brain research reviews*, 60(1), 267-277.
- Wu, C., Xie, N., Lian, Y., Xu, H., Chen, C., Zheng, Y., . . . Zhang, H. (2016). Central antinociceptive activity of peripherally applied botulinum toxin type A in lab rat model of trigeminal neuralgia. *Springerplus*, 5(1), 1-8.
- Xu, M., Aita, M., & Chavkin, C. (2008). Partial infraorbital nerve ligation as a model of trigeminal nerve injury in the mouse: behavioral, neural, and glial reactions. *The journal of pain*, 9(11), 1036-1048.
- Zimmermann, M. (1983). Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. In *Pain* (Vol. 16, pp. 109-110). [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(83\)90201-4](https://doi.org/10.1016/0304-3959(83)90201-4)
- Zogopoulos, P., Vasileiou, I., Patsouris, E., & Theocharis, S. E. (2013). The role of endocannabinoids in pain modulation. *Fundamental & clinical pharmacology*, 27(1), 64-80.
- Zuardi, A. W., Rodrigues, N. P., Silva, A. L., Bernardo, S. A., Hallak, J. E. C., Guimarães, F. S., & Crippa, J. A. S. (2017). Inverted U-shaped dose-response curve of the anxiolytic effect of cannabidiol during public speaking in real life. *Frontiers in pharmacology*, 259.
- Çankal, D., Akkol, E. K., Kılınc, Y., İlhan, M., & Capasso, R. (2021). An effective phytoconstituent aconitine: A realistic approach for the treatment of trigeminal neuralgia. *Mediators of Inflammation*, 2021, 1-8.

## **VIII. APÊNDICE**

---





UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto



**COMPROVANTE DE ENTREGA DE PROTOCOLO DE PESQUISA**

**Protocolo de Pesquisa N.:** 0039/2022

**Data de Entrega:** 14/03/2022

**Título do Trabalho:** Efeito do canabidiol sobre as vias de sinalização periférica do TRPV-1 em modelo animal de neuralgia trigeminal.

**Pesquisador Responsável:** Glauce Crivelaro do Nascimento

**Pesquisador Colaborador:** Daniela Maria Escobar Espinal

Prof. Dr. Francisco Wanderley Garcia de Paula e Silva  
Coordenador/a da Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa

Prof. Dr. Alan Grupioni Lourenço  
Vice-Coordenador/a da Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa