



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ - CAMPUS SOBRAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

SARAH RODRIGUES BASÍLIO

ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES TRPV1, TRPA1, TRPM8 E NMDA NO
EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO DERIVADO DITERPÊNICO SEMISSINTÉTICO
SM-2 EM ZEBRAFISH ADULTO

SOBRAL – CE

2024

SARAH RODRIGUES BASÍLIO

**ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES TRPV1, TRPA1, TRPM8 E NMDA NO
EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO DERIVADO DITERPÊNICO SEMISSINTÉTICO
SM-2 EM ZEBRAFISH ADULTO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará – *Campus Sobral*, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde. Área de concentração: Inflamação e Dor.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Hellíada Vasconcelos Chaves.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

B318e Basílio, Sarah Rodrigues.

ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES TRPV1, TRPA1, TRPM8 E NMDA NO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO DERIVADO DITERPÊNICO SEMISSINTÉTICO SM-2 EM ZEBRAFISH ADULTO / Sarah Rodrigues Basílio. – 2024.

57 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Campus de Sobral, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Sobral, 2024.

Orientação: Prof. Dr. Hellíada Vasconcelos Chaves.

1. Dor orofacial. 2. Zebrafish. 3. Nocicepção. 4. *Stemodia maritima*. I. Título.

CDD 610

SARAH RODRIGUES BASÍLIO

**ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES TRPV1, TRPA1, TRPM8 E NMDA NO
EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO DERIVADO DITERPÊNICO SEMISSINTÉTICO
SM-2 EM ZEBRAFISH ADULTO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação - Mestrado em Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Ceará – campus Sobral como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Heliáda Vasconcelos Chaves (Orientador)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof.(a) Dra. Mirna Marques Bezerra

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof(a). Dra. Adriana Rolim Campos

Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

Prof. Dr. Francisco Geraldo Barbosa

Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar sempre comigo e me proporcionar os meios e as possibilidades para eu conseguir realizar meus sonhos. À minha família, em especial minha mãe, que nunca mediu esforços para me auxiliar em tudo que preciso e abraçou esse sonho junto comigo. Meu irmão, por ser sempre meu melhor amigo e meu maior incentivador.

À minha orientadora, professora Hellíada, por todo auxílio e inspiração. Obrigada por sempre ter sido presente e por toda a orientação desde a graduação. Sou extremamente grata por todo o conhecimento científico a mim oferecido durante todo esse percurso. Deixo minha eterna gratidão a essa pesquisadora que fez um diferencial em toda a minha jornada.

Aos meus ICs que se tornaram amigos e que levarei para sempre: Natacha, Isaac, Jefferson, Pedro Isac e Mariana. Obrigada por toda ajuda e por sempre se mostrarem disponíveis sempre que precisei.

Às queridas Sacha, Trycia e Ana Livia pelo auxílio na realização dos experimentos. Sem vocês tudo teria sido mais difícil. Em especial à Sacha, por todo o auxílio, paciência e disponibilidade em ensinar e ajudar na realização dos experimentos.

Aos meus amigos de mestrado Emerson, Mykelly, Guilherme e Débora que sempre estiveram comigo tanto nos bons momentos quanto nos momentos difíceis. Muito obrigada por toda parceria e amizade!

Às amigas Ana Carla, Ester e Luziana, por todo o companheirismo.

À Professora Adriana Rolim e ao Nubex, pelo apoio técnico e pelos compostos usados nessa pesquisa.

À CAPES, CNPq e FUNCAP pelo suporte financeiro.

A todos aqueles que, direta e indiretamente, colaboraram tornando possível a elaboração dessa dissertação.

RESUMO

A dor orofacial é uma condição clínica prevalente na população com impacto na qualidade de vida dos pacientes. O manejo da dor orofacial pode envolver tanto abordagens não farmacológicas quanto farmacológicas. Contudo, é importante destacar que as terapias medicamentosas podem acarretar riscos substanciais e efeitos colaterais, tornando essencial a busca por novas alternativas terapêuticas farmacológicas. Em estudos prévios, o extrato de *Stemodia maritima* L., o diterpeno estemodina e o seu derivado semissintético SM-2 apresentaram efeitos antinociceptivos e anti-inflamatórios no tratamento da dor aguda da articulação temporomandibular (ATM), embora o mecanismo de ação subjacente de SM-2 ainda careça de elucidação. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos motor, antinociceptivo orofacial e ansiolítico de SM-2 em zebrafish adulto e investigar seu mecanismo de ação por meio dos receptores TRPV1, TRPA1, TRPM8 e NMDA. Para isso, foram utilizados zebrafish adultos, com n=8/grupo, tratados com SM-2 nas doses de 0,01 ou 0,1 µg/mL. A atividade motora do zebrafish foi avaliada por meio do teste de campo aberto. Em seguida, a nocicepção orofacial aguda foi induzida por capsaicina (agonista TRPV1), cinamaldeído (agonista TRPA1), mentol (agonista TRPM8) ou glutamato (agonista NMDA). Em outra sequência de experimentos, os animais foram pré-tratados com capsazepina (antagonista TRPV1), HC-030031 (antagonista TRPA1), AMTB (antagonista TRPM8) ou cetamina (antagonista NMDA), a fim de investigar o mecanismo de ação de SM-2. Além disso, a atividade ansiolítica de SM-2 também foi avaliada por meio do teste claro escuro. SM-2 não alterou o comportamento locomotor dos animais e SM-2 reduziu a nocicepção orofacial causada pelos agonistas dos receptores TRPV1, TRPA1, TRPM8 e NMDA. O pré-tratamento com HC-030031, AMTB ou cetamina não alterou o efeito antinociceptivo do SM-2, entretanto a administração da capsazepina preveniu o efeito de SM-2. O tratamento com SM-2 promoveu a maior permanência dos animais na zona clara do aquário, indicando o potencial ansiolítico de SM-2. Com base nesses achados, podemos sugerir que o SM-2 possui ação antinociceptiva mediada pelo receptor TRPV1, além de efeito do tipo ansiolítico.

Palavras-chave: Dor orofacial. Zebrafish. Nocicepção. *Stemodia maritima*

ABSTRACT

Orofacial pain is a prevalent clinical condition in the population with an impact on patients quality of life. The management of orofacial pain may involve both non-pharmacological and pharmacological approaches. However, it is important to highlight that drug therapies may entail substantial risks and side effects, making it essential to search for new pharmacological therapeutic alternatives. In previous studies, the extract of *Stemodia maritima* L., the diterpene stemodin and its semisynthetic derivative SM-2 showed antinociceptive and anti-inflammatory effects in the treatment of acute temporomandibular joint (TMJ) pain, although the underlying mechanism of action of SM-2 remains to be elucidated. Therefore, the aim of this study was to evaluate the motor, orofacial antinociceptive and anxiolytic effects of SM-2 in adult zebrafish and to investigate its mechanism of action through TRPV1, TRPA1, TRPM8 and NMDA receptors. For this purpose, adult zebrafish, with n = 8/group, treated with SM-2 at doses of 0.01 or 0.1 µg/mL were used. The motor activity of zebrafish was evaluated by means of the open field test. Then, acute orofacial nociception was induced by capsaicin (TRPV1 agonist), cinnamaldehyde (TRPA1 agonist), menthol (TRPM8 agonist) or glutamate (NMDA agonist). In another sequence of experiments, the animals were pretreated with capsazepine (TRPV1 antagonist), HC-030031 (TRPA1 antagonist), AMTB (TRPM8 antagonist) or ketamine (NMDA antagonist) in order to investigate the mechanism of action of SM-2. Furthermore, the anxiolytic activity of SM-2 was also evaluated by means of the light-dark test. SM-2 did not alter the locomotor behavior of the animals and SM-2 reduced orofacial nociception caused by TRPV1, TRPA1, TRPM8 and NMDA receptor agonists. Pretreatment with HC-030031, AMTB or ketamine did not alter the antinociceptive effect of SM-2, however, administration of capsazepine prevented the effect of SM-2. Treatment with SM-2 promoted a longer stay of the animals in the light zone of the aquarium, indicating the anxiolytic potential of SM-2. Based on these findings, we can suggest that SM-2 has an antinociceptive action mediated by the TRPV1 receptor, in addition to an anxiolytic-like effect.

Keywords: Orofacial pain. Zebrafish. Nociception. *Stemodia maritima*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fotografia parcial de um espécime de <i>Stemodia maritima</i> L	22
Figura 2 - Fórmula estrutural do diterpeno Estemodina	23
Figura 3 - Fórmula estrutural do derivado semissintético SM-2	23
Figura 4 - Representação esquemática do procedimento experimental de nocicepção em lábio em zebrafish adulto	28
Figura 5 - Avaliação de SM-2 na atividade locomotora em zebrafish adulto	32
Figura 6 - Efeito antinociceptivo orofacial do SM-2 no teste de capsaicina em zebrafish adulto	32
Figura 7 – Efeito antinociceptivo orofacial do SM-2 no teste de cinamaldeído em zebrafish adulto	34
Figura 8 – Efeito antinociceptivo orofacial do SM-2 no teste do mentol em zebrafish adulto	35
Figura 9 – Efeito antinociceptivo orofacial do SM-2 no teste do glutamato em zebrafish adulto	36
Figura 10 – Efeito da capsazepina sobre a atividade antinociceptiva de SM-2 no modelo de nocicepção orofacial induzida por capsaicina em zebrafish adulto	37
Figura 11 – Efeito do HC-030031 sobre a atividade antinociceptiva de SM-2 no modelo de nocicepção orofacial induzida por cinamaldeido em zebrafish adulto	38
Figura 12 – Efeito do AMTB sobre a atividade antinociceptiva de SM-2 no modelo de nocicepção orofacial induzida por mentol em zebrafish adulto	39
Figura 13 – Efeito da cetamina sobre a atividade antinociceptiva de SM-2 no modelo de nocicepção orofacial induzida por glutamato em zebrafish adulto	40
Figura 14 - Avaliação da atividade ansiolítica de SM-2	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

± SEM	Mais ou menos o erro padrão da média
ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de variância
AST	Aspartato aminotransferase
CEUA	Comissão de ética no Uso de Animais
cm	centímetros
DTM	disfunção temporomandibular
HO-1	Hemeoxigenase-1
<i>i.m</i>	Intramuscular
<i>i.p</i>	Intraperitoneal
NO	Óxido nítrico
NMDA	<i>N</i> -metil- <i>D</i> -aspartato
NUBEX	Núcleo de Biologia Experimental
OMS	Organização Mundial da Saúde
$p < 0,05$	Probabilidade de erro estatístico menor que 5%
TRP	Receptor de Potencial Transitório
TRPA1	Receptor de Potencial Transitório relacionado à proteína Anquirina
TRPM8	Receptor de Potencial Transitório Melastatina membro 8
TRPV1	Receptor de Potencial Transitório Vaniloide membro 1
TRPV4	Receptor de Potencial Transitório Vaniloide membro 4
UECE	Universidade Estadual do Ceará
UFC	Universidade Federal do Ceará
μL	Microlitros
μg	Microgramas
°C	Grau Celsius
μM	Micromolar
'	minutos
Δ	delta
v.o.	via oral
μ	Micro
%	Porcentagem
4NQO	4-Nitroquinolona 1-Óxido

ZnPP-IX Zinco protoporfirina-IX

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1 Dor e nocicepção	14
2.2 Dor orofacial	15
2.3 Receptores TRPs.....	16
2.4 TRPV1	16
2.5 TRPA1	17
2.6 TRPM8	18
2.7 NMDA.....	19
2.8 Zebrafish como modelo animal para o estudo da nocicepção	19
2.9 Produtos naturais e dor.....	20
2.9.1 <i>Gênero Stemodia, Stemodia maritima L. e derivados diterpênicos semissintéticos.....</i>	<i>21</i>
.....	21
3 JUSTIFICATIVA	24
4 OBJETIVOS	25
4.1 Objetivo geral.....	25
4.2 Objetivos específicos.....	25
5 METODOLOGIA.....	26
5.1 Aspectos éticos	26
5.2 Obtenção de SM-2	26
5.3 Zebrafish adulto.....	26
5.4 Delineamento experimental	26
5.4.1 Avaliação do efeito de SM-2 sobre a atividade locomotora de zebrafish adulto.	26
5.4.2 Avaliação do efeito antinociceptivo orofacial o SM-2 em zebrafish adulto.....	27
5.4.3 Nocicepção orofacial induzida por capsaicina	28
5.4.4 Nocicepção orofacial induzida por cinamaldeído	28

5.4.5 Nociceção orofacial induzida por mentol	29
5.4.6 Nociceção orofacial induzida por glutamato.....	29
5.4.7 Avaliação dos antagonistas Capsazepina, HC-030031, AMTB ou Cetamina sobre a antinociceção orofacial de SM-2 em zebrafish adulto.....	29
5.4.8 Avaliação da atividade ansiolítica de SM-2.....	30
5.5 Análise estatística.....	30
6 RESULTADOS	32
6.1 Avaliação de SM-2 na atividade locomotora em zebrafish adulto.....	32
6.2 Efeito antinociceptivo orofacial do SM-2 no teste da capsaicina em zebrafish adulto.	32
6.3 Efeito antinociceptivo orofacial do SM-2 no teste de cinamaldeído em zebrafish adulto.	33
6.4 Efeito antinociceptivo orofacial do SM-2 no teste do mentol em zebrafish adulto.....	34
6.5 Efeito antinociceptivo orofacial do SM-2 no teste do glutamato em zebrafish adulto.	35
6.6 Efeito da capsazepina sobre a atividade antinociceptiva de SM-2 no modelo de nociceção orofacial induzida por capsaicina em zebrafish adulto.....	36
6.7 Efeito do HC-030031 sobre a atividade antinociceptiva de SM-2 no modelo de nociceção orofacial induzida por cinamaldeído em zebrafish adulto.....	37
6.8 Efeito do AMTB sobre a atividade antinociceptiva de SM-2 no modelo de nociceção orofacial induzida por mentol em zebrafish adulto.....	38
6.9 Efeito da cetamina sobre a atividade antinociceptiva de SM-2 no modelo de nociceção orofacial induzida por glutamato em zebrafish adulto.	39
6.10 Avaliação da atividade ansiolítica de SM-2.....	40
7 DISCUSSÃO	42
8 CONCLUSÃO.....	46
REFERÊNCIAS	47
ANEXO A- CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	566

1 INTRODUÇÃO

A dor orofacial é definida como uma condição dolorosa relacionada a tecidos moles e mineralizados da cavidade oral e da face (Cavalcante *et al.*, 2020). As principais origens das dores orofaciais são odontogênicas, cefaleias, dores musculoesqueléticas e neurogênicas, câncer, infecções, doenças autoimunes e trauma tecidual, sendo a disfunção temporomandibular (DTM) a segunda causa mais relatada de dor orofacial (Carrara, 2010). A dor orofacial tem prevalência de cerca de 22-26% da população em geral, dos quais 7-11% apresentam dor crônica (Badel *et al.*, 2019). A ocorrência da dor orofacial nos pacientes pode causar repercussões biológicas e impacto sobre a qualidade de vida, levando a distúrbios do sono e afastamento das atividades laborais, sendo considerada um problema de saúde pública (Trize *et al.*, 2018).

Diante disso, novas possibilidades terapêuticas se fazem necessárias, visto que as atualmente utilizadas não são completamente eficazes (Ouanounou; Goldberg; Haas, 2017). Tem-se buscado, portanto, novos metabólitos a partir de plantas medicinais (POONAM; Sudip; Stefano, 2021). Um exemplo é a planta *Stemodia maritima* L. (*S. maritima*), um arbusto que cresce na região litorânea do Nordeste do país, que tem sido usada pela população local para tratar doenças de origem inflamatória (Rodrigues *et al.*, 2010). Em uma sequência investigativa, um estudo demonstrou que o extrato das folhas de *S. maritima* apresentou efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes e de redução da perda óssea no tratamento da periodontite (Teixeira *et al.*, 2017). Um estudo realizado pelo nosso grupo utilizando *S. maritima* e o diterpeno estemodina, demonstrou efeito na redução da dor inflamatória induzida por formalina na articulação temporomandibular (ATM) (Azevedo, 2019). Além disso, foi desenvolvido um novo composto a partir de transformação química na molécula da estemodina, denominado SM-2. Foi demonstrado que a administração por via oral de SM-2 em um modelo de hipernocicepção inflamatória induzida por formalina na ATM de ratos apresentou efeitos antinociceptivos (Fernandes, 2020). Em outra sequência experimental, a aplicação local na ATM de SM-2 apresentou efeito antinociceptivo em um modelo de dor inflamatória aguda na ATM de ratos (dados não publicados), entretanto seu mecanismo de ação não foi completamente elucidado.

Dessa forma, nas pesquisas sobre dor orofacial, um alvo que vem sendo explorado com frequência são os canais do tipo TRP, que estão expressos em neurônios sensoriais, importantes para detecção de estímulos nocivo (Yang *et al.*, 2023). Um estudo recente mostrou que os canais iônicos do tipo receptores de potencial transitório (TRP), particularmente TRPV1,

TRPA1, TRPV4 e TRPM8 desempenham um importante papel na transdução e patogênese da dor orofacial (Luo *et al.*, 2021). Por isso, grande atenção tem sido direcionada a estudos que investiguem seus papéis em diferentes patologias dolorosas, agudas e crônicas, e seu envolvimento no mecanismo de ação de novas drogas (Moran, 2018). Além disso, sabendo do potencial nociceptivo do glutamato e de seu receptor NMDA, existem evidências de que as vias de sinalização do glutamato interagem funcionalmente com os canais iônicos TRPs, sendo importantes atores na nocicepção trigeminal. Por isso, tem sido investigado o bloqueio de receptores de glutamato na redução de dor. Ademais, foi descoberto que uma variedade de antagonistas e moduladores dos receptores do tipo NMDA possuem efeitos analgésicos em pacientes com dor e, por isso, tem sido proposto como um alvo promissor para o tratamento da dor orofacial crônica (Liu *et al.*, 2022; Oliveira *et al.*, 2020)

Desse modo, o presente estudo se dispôs a investigar o mecanismo de ação de SM-2 através dos receptores TRPV1, TRPA1, TRPM8 e NMDA em um modelo experimental em zebrafish adulto a fim de poder contribuir para uma possível nova abordagem terapêutica no tratamento da dor orofacial.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Dor e nocicepção

Conforme a nova definição da *Associação Internacional para o Estudo da Dor* (IASP), a dor é definida como “uma experiência sensitiva e emocional desagradável associada a dano tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de tal dano” (Raja *et al.*, 2020). É considerada um problema de saúde pública, a qual requer abordagem abrangente e multidisciplinar (Carr, 2016). O nível de dor afeta diretamente na qualidade de vida dos pacientes, podendo ser um fator desencadeador de condições psicossociais, como por exemplo a depressão (Messias, 2020). Tal efeito depende da extensão, duração, intensidade, afetividade, significado da dor, doença base e características do indivíduo (Fillingim, 2017), por isso, pesquisas envolvendo os mecanismos da dor continuam sendo uma necessidade.

Sabe-se que a dor pode ser classificada temporalmente, podendo ser dividida em aguda ou crônica. A dor aguda é resultante de uma condição dolorosa de início rápido e duração limitada e destaca-se por alertar sobre situações potencialmente prejudiciais no organismo (Feizerfan; Sheh, 2015; Nix, 2017). Quando ocorre a persistência por mais de três meses, é gerado o estado de dor crônica, na qual indica um processo patológico de doença (Kuner *et al.*, 2019). Essas estão associadas, também, a maiores despesas para o sistema de saúde (Stockbridge; Suzuki; Pagán, 2014)

Além disso, a dor ainda pode ser dividida em três tipos: nociceptiva, neuropática e nociplástica. A dor provocada por estímulos nocivos na qual é gerada em resposta a um estímulo ambiental potencialmente prejudicial é chamada de nociceptiva. Os nociceptores respondem a estímulos mecânicos, químicos ou térmicos, que por sua vez, ativam vários receptores e produzem a sensação de dor (Khan, 2019). Recentemente, descobriu-se que os nociceptores são alvos terapêuticos atraentes para a dor crônica devido à sua sensibilização, localização fora da barreira hematoencefálica e especificidade relativa, por isso, vem tornando-se alvo de pesquisas (Dubin *et al.*, 2021). Já a dor neuropática é causada por uma lesão ou doença do sistema nervoso somatossensitivo (Finnerup, 2020). A dor nociplástica é um tipo de dor em que não há dano tecidual que possa ativar nociceptores (Trouvin, 2019). Aparece em condições de dor crônica, como dores de cabeça, DTM, fibromialgia e dor lombar (lombalgia) (Raja *et al.*, 2020) É desenvolvida devido a alterações no processamento nociceptivo, provavelmente devido à sensibilização central, que causa amplificação da sinalização neural e alteração na modulação da dor, provocando hipersensibilidade à dor. Os distúrbios com mecanismos de dor nociplástica

são frequentemente associados a outras comorbidades, como distúrbios do sono, fadiga, disfunção de memória e problemas de humor (Fitzcharles *et al.*, 2021).

A dor, assim, representa uma percepção subjetiva com dimensão psicológica, já a nocicepção consiste na recepção dos estímulos pelos nociceptores que codificam sinais para fornecer informações ao sistema nervoso central da existência de uma lesão. Portanto, dor seria o termo mais apropriado para o homem, enquanto nocicepção refere-se apenas ao estímulo doloroso, não leva em consideração o componente emocional (Julius, 2018). Pelo fato de os animais não serem capazes de expressar-se verbalmente, não se pode avaliar a dor neles, avaliando-se, portanto, a nocicepção. Dessa forma, os termos dor e analgesia são utilizados para pesquisas em humanos, e nocicepção e antinocicepção para pesquisas com estudos pré-clínicos (Apkarian, 2018; Jd; Rd, 2008).

2.2 Dor orofacial

A dor orofacial é definida como uma dor em região de face e/ou cavidade oral (Greenbaum, 2023) e a disfunção temporomandibular (DTM) é a segunda maior causa, seguida pelas dores odontogênicas (Cavalcante *et al.*, 2020). Em 2020, a *Classificação Internacional de Dor Orofacial* (ICOP) foi estabelecida, sendo considerada a primeira classificação hierárquica na qual aborda exclusivamente sobre dor orofacial. Pode-se citar 6 classes principais de dor orofacial: (1) dor orofacial atribuída a distúrbios das estruturas dentoalveolares e anatomicamente relacionadas; (2) dor orofacial miofascial; (3) dor na articulação temporomandibular; (4) dor orofacial atribuída à lesão ou doença dos nervos cranianos; (5) dor orofacial semelhante à apresentação de cefaleias primárias; e (6) dor orofacial idiopática (International Classification of Orofacial Pain, 1st edition (ICOP), 2020). A prevalência da dor orofacial varia entre 16,1 e 32,2%, reduzindo consideravelmente a qualidade de vida (HORST *et al.*, 2015) e é mais prevalente em mulheres do que homens (Häggman-henrikson *et al.*, 2020). Além disso, um estudo recente mostrou que existe uma relação positiva entre dor orofacial e ansiedade, sendo a ansiedade um fator de risco para dor orofacial, principalmente a dor orofacial crônica (Rahardian, 2024).

Em relação à disfunção temporomandibular (DTM), já foi demonstrado que pacientes com essa condição tem maior incapacidade para o trabalho do que a população em geral e está associada ao aumento de licenças médicas e a menor qualidade de vida relacionada a saúde, especialmente em mulheres (vallin *et al.*, 2024).

O manejo da dor orofacial é específico para cada diagnóstico, e um plano de tratamento é traçado baseado em modalidades não farmacológicas e farmacológicas. Em relação às farmacológicas, pode-se citar: anti-inflamatórios, anticonvulsivantes, antidepressivos, analgésicos, relaxantes musculares e anestésicos (Dalewski *et al.*, 2019) entretanto, o uso crônico destas medicações pode aumentar o risco de reações adversas a medicamentos (Ouanounou; Goldberg; Haas, 2017).

2.3 Receptores TRPs

A compreensão da transdução sensorial da dor em relação aos seus mecanismos moleculares vem avançando rápido devido, também, à descoberta e caracterização funcional dos canais TRPs (Luo *et al.*, 2021). Os membros da família são expressos em estruturas orofaciais, incluindo neurônios do gânglio trigeminal, odontoblastos, vasculatura, células imunológicas e células-tronco mesenquimais (Hargreaves; Ruparel, 2016). São expressos praticamente em todos os tipos de células. Estão classificados em 6 subfamílias, de acordo com a sua sequência de aminoácidos, tais como: TRPV (vaniloide), TRPM (melastatina), TRPA (anquirina), TRPML (mucolipina), TRPP (policistina) e TRPC (canônico) (Huang *et al.*, 2012; Pereira, 2014)

Estímulos potencialmente nocivos como calor, pressão mecânica ou produtos químicos são detectados por nociceptores em um processo chamado nocicepção. A participação dos canais do tipo TRP na dor e na inflamação está bem estabelecida, e estudos mostram que esses canais participam da transmissão nervosa sensorial tanto a nível periférico quanto a nível central (Behrendt, 2019). A utilização da modulação dos canais do tipo TRP foi identificada como uma estratégia importante no manejo de condições dolorosas (Jansen *et al.*, 2019). Sabe-se que alguns canais são ativados por estímulos nociceptivos como por exemplo o TRPV1 e TRPA1. Dessa forma, estes vêm se tornando alvo interessante na descoberta de novos analgésicos (IFTINCA, 2021)

2.4 TRPV1

Dentre a família dos TRPs, TRPV1 são os canais mais conhecidos, sendo estes os primeiros membros do grupo de receptores vaniloides a serem caracterizados (Oliveira *et al.*, 2020). São canais catiônicos não seletivos que podem ser ativados pelo calor, redução do pH ou substâncias exógenas como a capsaicina (8-methyl-N-vanilil-6-nonanamida), composto

isolado da pimenta vermelha-*Capsicum sp*, e por outras toxinas provenientes de plantas, sendo a resiniferatoxina a mais potente (Oliveira *et al.*, 2020). Os efeitos da capsaicina são entendidos devido as suas ações excitatórias e dessensibilizantes em nociceptores polimodais (Parisi, 2016).

Alguns estudos demonstraram que o TRPV1 se encontra amplamente distribuído em neurônios sensoriais do gânglio da raiz dorsal e nas fibras aferentes primárias do tipo Aδ e C (Hwang, 2005; Morgan, 2019). Seu papel no sistema nervoso central (SNC) envolve processamento e modulação da dor, neurogênese e termorregulação (Alawi *et al.*, 2015). Por isso, TRPV1 tem sido alvo de constantes investigações devido ao seu papel na nocicepção e inflamação (Caterina *et al.*, 2000). Alguns estudos demonstraram a eficiência que os antagonistas dos receptores TRPV1 apresentam na diminuição da nocicepção em modelos animais de inflamação, osteoartrite e neuropatia (Pereira, 2014).

A relação entre os canais TRPV1 e a dor orofacial foi relatada em um estudo no qual seu antagonista é utilizado como tratamento (Galdani *et al.*, 2015). Ademais, outro estudo demonstrou que o TRPV1 é expresso em amostra de neurônios somatossensitivos do gânglio trigeminal em larva de zebrafish (GAU *et al.*, 2013) bem como a presença dos canais iônicos em zebrafish adulto (Levanti *et al.*, 2016).

2.5 TRPA1

Os canais TRPA1 pertencem à superfamília de receptores TRP, é expresso preferencialmente em neurônios nociceptivos primários, é ativado por frio nocivo (Koivisto, 2018) e tem ganhado destaque devido a seu importante papel na condução da informação nociceptiva em condições inflamatórias (Andrade, 2008).

o principal mecanismo de ativação do trpa1 se dá por modificações covalentes em resíduos de cisteína. Essas modificações são induzidas pela ação de agonistas exógenos e endógenos. Dentre os exógenos, pode-se citar o óleo de mostarda, cinamaldeído (derivado da canela), alicina (derivado do alho) e Δ9-tetrahydrocannabinol (THC). Em relação aos agonistas endógenos, PLC (fosfolipase C) ativadas por sinais acoplados à proteína G, principalmente pela ativação de receptores de bradicinina e também as espécies reativas de oxigênio, são cruciais para ativar o TRPA1 em muitos distúrbios caracterizados pelo estresse oxidativo, como dor neuropática, inflamação, osteoartrite e enxaqueca (Macpherson *et al.*, 2007).

Os canais TRPA1 são expressos nos gânglios da raiz dorsal e neurônios trigeminiais e em uma subpopulação de nociceptores não mielinizados que também expressam o receptor

TRPV1, demonstrando um importante papel na nocicepção (Moccia; Montagna, 2023). O papel do TRPA1 na nocicepção inflamatória foi descrito em um trabalho mostrando que o bloqueio farmacológico ou a deleção genética do canal reduziram a primeira e a segunda fase da resposta nociceptiva induzida pela formalina na pata de rato e camundongo (Mcnamara *et al.*, 2007). Por isso, o TRPA1 demonstrou um potencial alvo no tratamento da dor (Araújo, 2020)

Em relação à dor orofacial, injeções intramusculares de agonistas de TRPA1 despertaram respostas nociceptivas e hiperalgesia mecânica em fibras aferentes musculares (Asgar *et al.*, 2015) entretanto a inibição de TRPA1 no músculo masseter diminuiu a dor espontânea (Wang *et al.*, 2018) A injeção intramuscular de AP18 (um antagonista seletivo de TRPA1) bloqueou o progresso da hipersensibilidade mecânica aguda e da dor muscular persistente (Asgar *et al.*, 2015) Além disso, TRPA1 também é expresso em um grande número de axônios que se ramificam extensivamente na polpa dentária (Hossain *et al.*, 2019).

2.6 TRPM8

TRPM8 é um canal iônico não seletivo, com ativação polimodal, que possui relação com algumas doenças, como por exemplo a enxaqueca (González-muñiz, 2019). é expresso em uma subpopulação de neurônios do gânglio da raiz dorsal sensíveis ao frio, em nervos sensoriais, e também foi encontrado na bexiga e no trato genital masculino (Peier *et al.*, 2002)

Os canais TRPM8 são ativados por temperaturas moderadamente frias (8 a 27° C) e por compostos refrescantes como mentol, eucaliptol e icilina. São os principais detectores de temperatura fria *in vivo* possuindo implicações nas sensações somáticas, nocicepção e desenvolvimento de analgesia (Almeida, 2015).

O papel do TRPM8 na modulação da percepção da dor foi amplamente avaliado por meio de camundongos deficientes em TRPM8 (Knowlton, 2010). O TRPM8 está implicado na hipersensibilidade ao frio e teoriza-se que alivia a dor inflamatória ou neuropática, mas ainda há controvérsia sobre os efeitos do agonismo e antagonismo do TRPM8 na percepção da dor. É provável que o TRPM8 seja expresso para funções aferentes ao frio, e a modulação do receptor mostre potencial para analgesia termorreceptiva da dor (González-Muñiz, 2019). Foi descoberto recentemente que novos inibidores de TRPM8 reduziram notavelmente a alodinia fria e mecânica em modelos de dor aguda e crônica (Caro *et al.*, 2018).

Em relação ao envolvimento com a dor orofacial, administração subcutânea de mentol, um agonista do TRPM8, na bochecha, aumentou ainda mais a dor ao frio na neuropatia trigeminal induzida por lesão nervosa constrictiva crônica do nervo infraorbital. Em contraste, a

inibição do TRPM8 com capsazepina reduziu significativamente a dor ao frio. Esses dados comportamentais sugerem que o TRPM8 pode desempenhar um papel na alodinia ao frio e na hiperalgesia após lesão crônica do nervo trigêmeo (Zuo, 2013).

2.7 NMDA

O glutamato é um importante neurotransmissor excitatório no sistema nervoso central de mamíferos, atuando tanto em canais iônicos controlados por ligantes (ionotrópicos) quanto em receptores metabotrópicos acoplados à proteína G. Os receptores ionotrópicos são subdivididos em receptores NMDA (ácido glutamina-*N*-metil-*D*-aspártico) e não-NMDA [ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA) e ácido cáinico]. Estão envolvidos na transmissão espinhal de informações nociceptivas em condições fisiológicas e patológicas. No entanto, apenas os receptores NMDA são encontrados nas células ganglionares do trigêmeo (Piovesan *et al.*, 2008)

Os dois sistemas de modulação nociceptiva mais importantes são mediados por receptores NMDA e opioides, distribuídos por toda extensão do sistema nervoso central. Entre os três principais subtipos de receptores opioides, os receptores μ e δ podem inibir ou potencializar eventos mediados pelos receptores NMDA, enquanto o receptor κ antagoniza a atividade mediada por receptores NMDA (Riedel; Neeck, 2001).

Além disso, o glutamato, principalmente por meio de receptores NMDA, exercem um papel importante nos quadros de dor crônica e neuropática. Também há estudo demonstrando que NMDA desempenha um papel tanto em processos emocionais quanto cognitivos, incluindo o interesse do papel desse receptor em estados ansiosos (Wang; Bian; Yin; Guo, 2022).

Foi descoberto recentemente que a dor e a hiperalgesia mecânica induzidas pela injeção de glutamato no masseter são atenuadas pelo tratamento com cetamina, que bloqueia os receptores NMDA. Esses resultados indicam que os receptores NMDA periféricos contribuem para inflamação, nocicepção e hiperalgesia nos músculos masseter (Chung; Ro, 2020).

2.8 Zebrafish como modelo animal para o estudo da nocicepção

Devido ao avanço nas pesquisas, a ciência vem buscando alternativas que possam, de maneira fidedigna, se aproximar de modelos experimentais que gerem menores custos e esteja associado filogeneticamente ao homem.(Choi *et al.*, 2021). É nesse contexto que está inserido a utilização do *danio rerio*, popularmente conhecido como zebrafish (Lawrence, 2007). cerca de 70% dos genes humanos possuem ortólogos do zebrafish, fornecendo informações valiosas para investigação de doenças genéticas humanas e a compreensão da função do gene dos vertebrados (Howe *et al.*, 2013), sendo então considerado uma ferramenta valiosa para neurociência translacional e pesquisa farmacológica (Kalueff, 2014).

Ademais, por meio de modelos com zebrafish é possível reduzir o uso de mamíferos em pesquisas, em alinhamento com o princípio dos 3r (replacement, reduction and refinement), pois além de permitir a substituição e a redução de animais mais complexos pelo uso do zebrafish é possível a observação de processos biológicos complexos em um organismo transparente e de rápida reprodução, o que reduz a necessidade de intervenções invasivas, contribuindo para o bem-estar animal (Bauer, 2021).

Outros fatores no quais justificam seu destaque no meio científico são: alta reprodutividade, ciclo reprodutivo curto, tamanho pequeno (que oferece como vantagem menor quantidade da substância a ser estudada) e baixo custo (Dai *et al.*, 2014). Além disso, um estudo realizado demonstrou que a utilização de algumas substâncias algôgenicas utilizadas em roedores para testes nociceptivos também alteraram o comportamento de natação em zebrafish no qual sugere a utilização desse como um modelo rápido e econômico para avaliar nocicepção (Taylor *et al.*, 2017). Alguns estudos também foram realizados para avaliação de nocicepção orofacial e zebrafish. Em relação a modulação dos canais TRPV1, foi demonstrado que a utilização do carvedilol possuía uma aplicação clínica potencial como inibidor da nocicepção orofacial (Barros *et al.*, 2019). Outro estudo envolvendo a utilização da Lectina de *Parkia platycephala* (PPL) reduziu o comportamento nociceptivo em peixes-zebra adultos (Leite *et al.*, 2022)

2.9 Produtos naturais e dor

A utilização de plantas medicinais como forma de tratamento, cura e prevenção de doenças é considerada uma prática milenar empregada até os dias atuais e, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 80% da população mundial faz uso de plantas medicinais para suprir necessidades de assistência médica na atenção primária (Organization, 2019; Patrício *et al.*, 2022)

Como forma de reduzir os efeitos adversos gerados pelos fármacos, tem sido explorado como tratamento de condições dolorosas e inflamatórias o uso de plantas com potencial fitoterápico. Estes têm sido fonte de novos fármacos com uma significativa atividade biológica, como por exemplo os terpenos, que conferem atividades anti-inflamatórias, antibacterianas, antifúngica e antioxidante (Siqueira-Lima *et al.*, 2014) Além disso, compostos advindos de produtos naturais que possuem efeito analgésico, podem agir por diferentes vias de sinalização, sendo uma dessas a ativação das vias dos canais TRPs (Calixto, 2005)

O Brasil por ser um país com uma rica, extensa e diversa flora, possibilita o acesso a uma grande quantidade de produtos naturais, os quais podem ser potencialmente ativos como antimicrobianos, anti-inflamatórios, imunomoduladores e neuromoduladores (Oliveira, 2017) e com potencial analgésico, como é o caso da *S. maritima* (Fernandes, 2020).

2.9.1 Gênero *Stemodia*, *Stemodia maritima* L. e derivados diterpênicos semissintéticos

O gênero *Stemodia* pertence à família Plantaginaceae, sendo representada por espécies distribuídas na Ásia, África, Austrália e América. As plantas desse gênero possuem uso etnofarmacológico, são do tipo herbácea, perene e possuem por volta de 50 cm de altura. Suas folhas são simples e sésseis. As flores são isoladas, pedunculadas e com coloração lilás. Os diterpenos contendo um esqueleto tetracíclico incomum, conhecido como estemodano, são os compostos que caracterizam quimicamente as plantas desse gênero (Sousa, 2017).

Dentre as plantas do gênero *Stemodia* com potencial medicinal, destaca-se a espécie *S. maritima*, que é um arbusto perene, encontrado na região Nordeste do Brasil, próxima à costa marítima, onde é conhecida como “melosa” ou “mastruz-bravo” (Figura 1) (Fernandes, 2020; Rodrigues *et al.*, 2010). Tem sido utilizada para dor de estômago, hidropisia e inchaço local pela população local (Rodrigues; Lima; Oliveira *et al.*, 2014). Além disso, alguns estudos demonstraram que as folhas e o caule possuem atividade antiviral, citotóxica, larvicida e bactericida (Azevedo, 2019; Silva; Rodrigues *et al.*, 2014). A atividade antioxidante *in vitro* e contra algumas cepas bacterianas foi demonstrada para *S. maritima* (Silva *et al.*, 2014). Outro estudo do nosso grupo mostrou que o extrato das folhas de *S. maritima* apresentou efeitos anti-inflamatório, antioxidantes e na redução da perda óssea no tratamento da periodontite (Teixeira *et al.*, 2017)

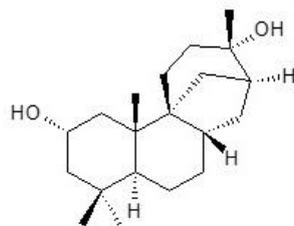
Figura 1 -Fotografia parcial de um espécime de *Stemodia maritima* L.



Fonte: <https://x.gd/lqfoA>

Dentre os metabólitos secundários relatados para *S.maritima* estão os diterpenos, estemodina, estemodinol e estemodinosídeo B; além dos compostos fenólicos jaceidina, verbascosídeo, isoverbascosídeo, crenatosídeo e isocrenatosídeo (Silva *et al.*, 2014). A estemodina é o diterpeno estemodano mais relatado para *S.maritima* (Figura 2) e o nosso grupo demonstrou o efeito antinociceptivo de *S. maritima* e da estemodina em um modelo de hipernocicepção aguda na ATM de ratos induzida por formalina e capsaicina (Azevedo, 2019).

Figura 2. Fórmula estrutural do diterpeno Estemodina



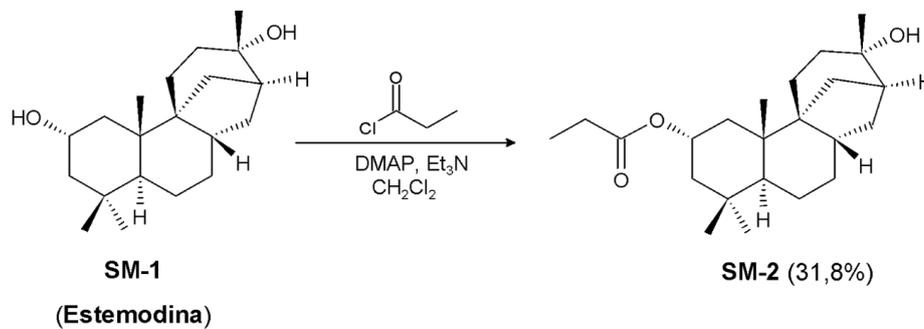
SM-1
(Estemodina)

Fonte: Oliveira, 2021.

A partir da estemodina (SM-1), foram obtidos dois derivados semissintéticos, denominados SM-2 e SM-3. O efeito antinociceptivo dos derivados SM-2 e SM-3 em ATM de ratos foi demonstrado quando utilizados por via oral (Fernandes, 2020). SM-2, por ser uma nova molécula, foi objeto de depósito de patente BR102024007891-8_870240034490 em 2024. Foi observado também que a aplicação local de SM-2 na ATM resultou em efeito analgésico (dados não publicados). Além disso, foi mostrado o efeito do SM-2 no tratamento de carcinoma

de células escamosas em língua, bem como realizada avaliação da toxicidade de SM-2, comprovando sua segurança (Alves, 2023). Apesar desses achados, não se conhece por completo o mecanismo de ação de SM-2 nem seu efeito na ansiedade.

Figura 3. Fórmula estrutural do SM-2



Fonte: Autor.

3 JUSTIFICATIVA

A dor orofacial é classificada como um dos tipos mais prevalentes de desordens dolorosas, visto que dados recentes mostram que afeta cerca de 25% da população, reduzindo significativamente a qualidade de vida das pessoas acometidas (Benoliel *et al.*, 2019). É percebido também que pacientes com sintomas de dor orofacial, principalmente a DTM, relatam taxas maiores de ansiedade e depressão do que indivíduos sem sintomas de dor (Leeuw, 2008), por isso a relevância de se estudar novas terapêuticas.

De forma a reduzir os efeitos gerados pelos fármacos atualmente empregados no tratamento da dor orofacial, vem sendo cada vez mais frequente o interesse na utilização de compostos naturais à base de plantas medicinais como fonte de moléculas bioativas (Oliveira *et al.*, 2020). Prova disso são os compostos à base de produtos naturais que possuem propriedades antinociceptivas (Yousofvand; Moloodi, 2022). A utilização de terpenos naturais e sintéticos é uma dessas possíveis abordagens, visto que eles estimulam a sinalização mediada pelos canais TRPs em mamíferos e algumas dessas moléculas sinalizadoras podem atuar em diferentes alvos dos receptores (Santos *et al.*, 2022)

Nesse contexto, o SM-2, um diterpeno semisintético, pode representar uma opção terapêutica interessante para o manejo da dor orofacial considerando um estudo que comprova seu efeito antinociceptivo e anti-inflamatório na ATM de ratos quando aplicado tanto sistemicamente (via oral) (Fernandes, 2020) quanto localmente na ATM (dados não publicados). Além disso, foi demonstrado sua segurança pré-clínica (Alves, 2023).

Tendo em vista as propriedades já apresentadas do SM-2, e pelo fato de pouco se conhecer seu mecanismo de ação, torna-se interessante estudar as possíveis vias pelas quais SM-2 pode atuar na redução da nocicepção orofacial. Além disso, considerando que o manejo dor exige uma abordagem multidisciplinar e que o nível da dor pode ser um fator desencadeador de condições psicossociais, torna-se interessante estudar o efeito ansiolítico de SM-2.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito orofacial e ansiolítico de SM-2 em zebrafish adulto

4.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do SM-2 na atividade motora dos animais;
- Investigar o envolvimento dos receptores TRPV1, TRPA1, TRPM8 e NMDA na ação antinociceptiva orofacial de SM-2.
- Avaliar possível atividade ansiolítica de SM-2.

5 METODOLOGIA

5.1 Aspectos éticos

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para uso de animais da Universidade Estadual do Ceará com o número de protocolo 05299177/2021.

5.2 Obtenção de SM-2

A planta *S. maritima* foi coletada em outubro de 2020, na cidade de Pentecoste, CE. Sua utilização para fins científicos foi cadastrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN cadastro nº ACEDEC6). A partir do extrato hexânico obtido das folhas de *S. maritima*, foi isolado o diterpeno estemodina (SM-1) que teve sua estrutura modificada quimicamente, através de uma reação de acilação para obtenção do derivado SM-2 (figura 3). Todo o processo de obtenção do derivado semissintético SM-2 foi realizado pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Fitoquímica Aplicada (LABFITO) da Universidade Federal do Ceará.

5.3 Zebrafish adulto

Zebrafish (*Danio rerio*) adultos (n=208), fenótipo cauda curta, selvagens, machos e fêmeas, com idade média de 60-90 dias, tamanho variando de $0,3 \pm 0,5$ g foram obtidos da Agroquímica: Comércio de Produtos Veterinários LTDA (Fortaleza, Ceará, Brasil). Os peixes foram aclimatados em grupos de 60 animais durante um período de 24 h. A aclimação ocorreu em aquários de vidro com as seguintes referências (30 x 15 x 20 cm), na qual continham água desclorada (ProtecPlus®) e bombas de ar com filtros submersos, com ciclo circadiano de 14:10 h de claro/escuro, a 25° C e contendo pH 7. Antes de iniciar os testes, os peixes receberam água e alimentação *ad libitum* ilimitada por um período de 24 h.

5.4 Delineamento experimental

5.4.1 Avaliação do efeito de SM-2 sobre a atividade locomotora de zebrafish adulto.

Foi utilizado o teste de campo aberto nos animais, baseado em metodologia proposta anteriormente (Ahmad, 2013) para avaliar se o SM-2 modificaria a coordenação motora dos peixes, fosse por sedação e/ou relaxamento muscular. Os animais foram pré-tratados (n=8/grupo) com 20 μ L via oral (*v.o*) de SM-2 (0,01 ou 0,1 μ g/mL) ou veículo (solução salina 0,9%). Além disso, um grupo naive foi incluído (n=8/grupo).

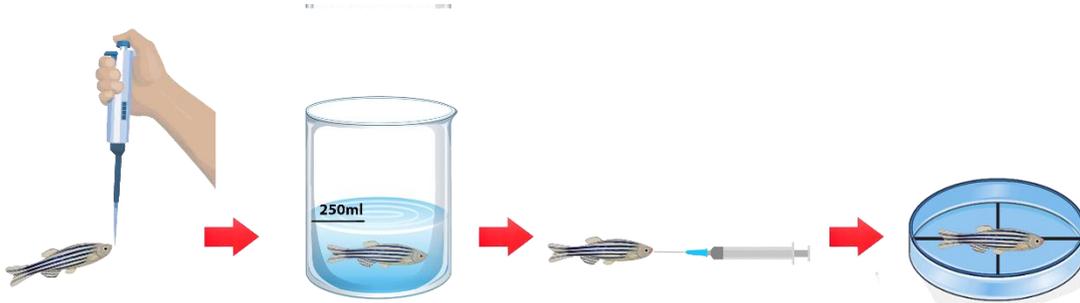
Após 60 minutos do pré-tratamento, os animais foram adicionados em placas de Petri (10mm x 15 cm) contendo a mesma água do aquário e dividido em quadrantes. A avaliação realizada por meio da contagem do número de cruzamentos de linhas foi registrada individualmente no intervalo de 0-5'.

5.4.2 Avaliação do efeito antinociceptivo orofacial o SM-2 em zebrafish adulto

Os experimentos com zebrafish adultos foram realizados baseados em estudos prévios (Magalhães *et al.*, 2017) No dia dos testes, os peixes foram randomizados e transferidos para uma esponja úmida (n=8/grupo), tratados com o SM-2 nas doses de 0,01 ou 0,1 μ g/mL ou controles por via oral (*v.o*). Logo após, foram acondicionados em béqueres de vidro (250 mL), individualmente, contendo 150 mL de água do aquário para repouso. Além disso, um grupo naive foi incluído. Para os tratamentos via oral, foi utilizada pipeta automática de 20 μ L e, para indução nociceptiva, foi utilizada uma seringa (0,3 mL; UltraFine® BD) com uma agulha de calibre 31 G.

Após 60 minutos da aplicação de SM-2, a indução da nocicepção foi realizada por injeção intra-muscular (i.m) de 5 μ L de capsaicina (40,93 μ M), cinamaldeído (0,33 μ M), mentol (1,2 mM) ou glutamato (12,5 μ M) no lábio inferior do zebrafish adulto (n= 8/grupo). Após os tratamentos com os agentes nociceptivos, os animais foram alocados em uma placa de Petri (10x15 cm), divididas em quadrantes, e, então, a resposta nociceptiva foi quantificada pelo número de cruzamentos em cada quadrante, avaliadas pelo período de tempo de 10-20' para capsaicina, 0-5' para cinamaldeído, 0-10' para mentol e 0-15' para glutamato (Figura 3).

Figura 4. Representação esquemática do procedimento experimental de nocicepção em lábio em zebrafish adulto



Fonte: Autora, adaptado de Soares *et al.*, 2019.

5.4.3 Nocicepção orofacial induzida por capsaicina

O teste de nocicepção orofacial foi realizado com a indução de 5 μL de capsaicina (40,93 μM ; agonista TRPV1), via *i.m.*, nos lábios dos peixes ($n=8/\text{grupo}$), 60 minutos após o tratamento com 20 μL de SM-2 (0,01 ou 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ou veículo (salina a 0,9 %) por via oral. A resposta nociceptiva foi avaliada no período de 10-20'. Além disso, um grupo naive foi incluído. Grupo naive: nenhum procedimento foi realizado nesses animais;

Grupo controle: submetido à aplicação de veículo (salina a 0,9%);

Grupo Capsaicina: tratados com 20 μL de veículo e capsaicina (40,93 μM);

Grupos SM-2: tratados com 20 μL (v.o) de SM-2 (0,01 ou 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 60 minutos antes da capsaicina.

5.4.4 Nocicepção orofacial induzida por cinamaldeído

O teste de nocicepção orofacial foi realizado com a indução de 5 μL de cinamaldeído (0,33 μM ; agonista TRPA1), via *i.m.*, nos lábios dos peixes ($n=8/\text{grupo}$), 60 minutos após o tratamento com 20 μL de SM-2 (0,01 ou 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ou veículo (salina a 0,9 %) por via oral. Além disso, um grupo naive foi incluído. A resposta nociceptiva foi avaliada no período de 0-5'.

Grupo naive: nenhum procedimento foi realizado nesses animais;

Grupo controle: submetido à aplicação de veículo (salina a 0,9%);

Grupo Cinamaldeído: tratados com 20 μL de veículo e cinamaldeído (0,33 μM);

Grupos SM-2: tratados com 20 μ L (v.o) de SM-2 (0,01 ou 0, 1 μ g/mL), 60 minutos antes do cinamaldeído.

5.4.5 Nociceção orofacial induzida por mentol

O teste de nociceção orofacial foi realizado com a indução de 5 μ L de mentol (1,2 mM; agonista TRPM8), via *i.m.*, nos lábios dos peixes (n=8/grupo), 60 minutos após o tratamento com 20 μ L de SM-2 (0,01 ou 0, 1 μ g/mL) ou veículo (salina a 0,9%) por via oral. Além disso, um grupo naive foi incluído. A resposta nociceptiva foi avaliada no período de 0-10'.

Grupo naive: nenhum procedimento foi realizado nesses animais;

Grupo controle: submetido à aplicação de veículo (salina a 0,9%);

Grupo Mentol: tratados com 20 μ L de veículo e mentol (1,2 mM);

Grupos SM-2: tratados com 20 μ L (v.o) de SM-2 (0,01 ou 0, 1 μ g/mL), 60 minutos antes do mentol.

5.4.6 Nociceção orofacial induzida por glutamato

O teste de nociceção orofacial foi realizado com a indução de 5 μ L de glutamato (12,5 μ M; agonista NMDA), via *i.m.*, nos lábios dos peixes (n=8/grupo), 60 minutos após o pré-tratamento com 20 μ L de SM-2 (0,01 ou 0,1 μ g/mL) ou veículo (salina a 0,9%) por via oral. Além disso, um grupo naive foi incluído. A resposta nociceptiva foi avaliada no período de 0-15'.

Grupo naive: nenhum procedimento foi realizado nesses animais;

Grupo controle: submetido à aplicação de veículo (salina a 0,9%);

Grupos Glutamato: serão tratados com 20 μ L de veículo e glutamato (12,5 μ M);

Grupos SM-2: tratados com 20 μ L (v.o) de SM-2 (0,01 ou 0, 1 μ g/mL), 60 minutos antes do glutamato.

5.4.7 Avaliação dos antagonistas Capsazepina, HC-030031, AMTB ou Cetamina sobre a antinociceção orofacial de SM-2 em zebrafish adulto.

Para esses experimentos, os animais (n=8/grupo) receberam intra-peritonealmente (i.p) capsazepina (0,5 mg/mL; antagonista TRPV1), HC-030031 (0,1 mg/mL; antagonista TRPA1), AMTB (0,3 mg/mL; antagonista TRPM8) ou cetamina (0,001 %; antagonista NMDA), 15 minutos antes do tratamento com 20 µL de SM-2 na melhor dose (via oral).

Grupo naive: nenhum procedimento foi realizado nesses animais;

Grupo controle: Foi realizada aplicação de veículo solução salina estéril 0,9%, (i.p) no início do experimento e, após 15 min, recebeu solução salina estéril 0,9%, (v.o.), (n = 8);

Grupo Capz-Capsaicina: Foi realizada aplicação de capsazepina (0,5 mg/mL; antagonista TRPV1), 15 minutos antes do tratamento com SM-2, e avaliada a resposta nociceptiva induzida por capsaicina (n=8);

Grupo HC-Cinamaldeido: Foi realizada aplicação de HC-030031 (0,1 mg/mL; antagonista TRPA1), 15 minutos antes do tratamento com SM-2 e avaliada a resposta nociceptiva induzida por cinamaldeido (n=8);

AMTB-Mentol: Foi realizada aplicação de AMTB (0,3 mg/mL; antagonista TRPM8), 15 minutos antes do tratamento com SM-2, e avaliada a resposta nociceptiva induzida por mentol;

Cetamina-Glutamato: Foi realizada aplicação de cetamina (0,001 %; Antagonista NMDA), 15 minutos antes do tratamento com SM-2, e avaliada a resposta nociceptiva induzida por glutamato.

5.4.8 Avaliação da atividade ansiolítica de SM-2

A atividade ansiolítica foi avaliada por meio do teste claro e escuro, reproduzido conforme estudo realizado previamente (RO, 2009). Os animais foram tratados (n=8/grupo) com 20 µL de SM-2 (0,01 ou 0,1 µg/mL) ou veículo (salina a 0,9%) por via oral. Além disso, um grupo naive foi incluído. Após 60 minutos, os animais foram adicionados em um aquário de vidro, individualmente, na região clara, contendo 3 centímetros de água, na qual o tempo de permanência na porção clara foi contabilizado num intervalo de 0-5'.

5.5 Análise estatística

Os resultados foram expressos como valores da média ± erro padrão da média. Após a confirmação da normalidade de distribuição e homogeneidade dos dados, as diferenças entre os grupos foram submetidas a análise de variância (ANOVA one-way) seguida do teste de

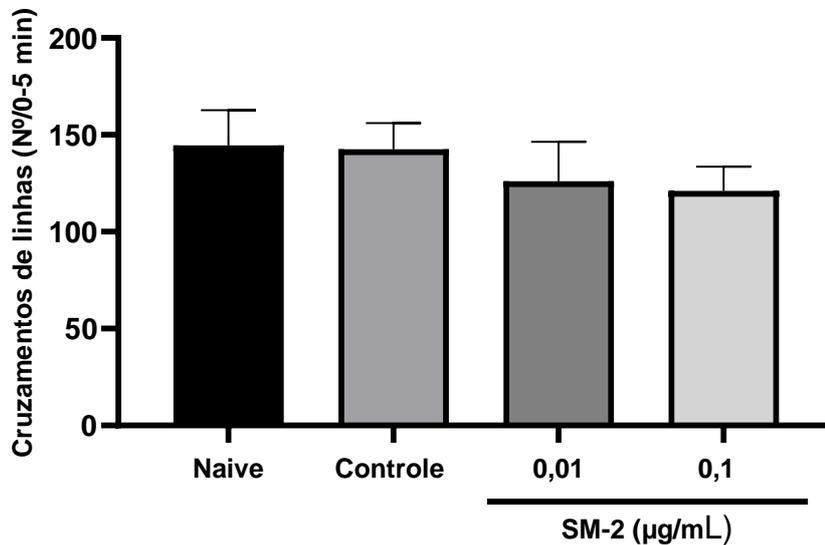
Tukey para comparações *post hoc*. As análises foram realizadas com o software GraphPad Prism v. 10.1. O nível de significância estatística foi estabelecido em 5% ($p < 0,05$).

6 RESULTADOS

6.1 Avaliação de SM-2 na atividade locomotora em zebrafish adulto.

SM-2 não alterou a atividade locomotora do zebrafish adulto conforme pode ser observado na figura 4. Não houve diferença estatística entre os grupos tratados com SM-2 0,01 $\mu\text{g/mL}$ ($126 \pm 20,39$) ou 0,1 $\mu\text{g/mL}$ ($121,1 \pm 12,42$) ($p < 0,9967$) e os grupos naive ($142,6 \pm 13,53$) ou controle ($144,5 \pm 18,17$) ($p < 0,9998$).

Figura 5. Efeito do SM-2 sobre a atividade locomotora de zebrafish adulto no teste de campo aberto.

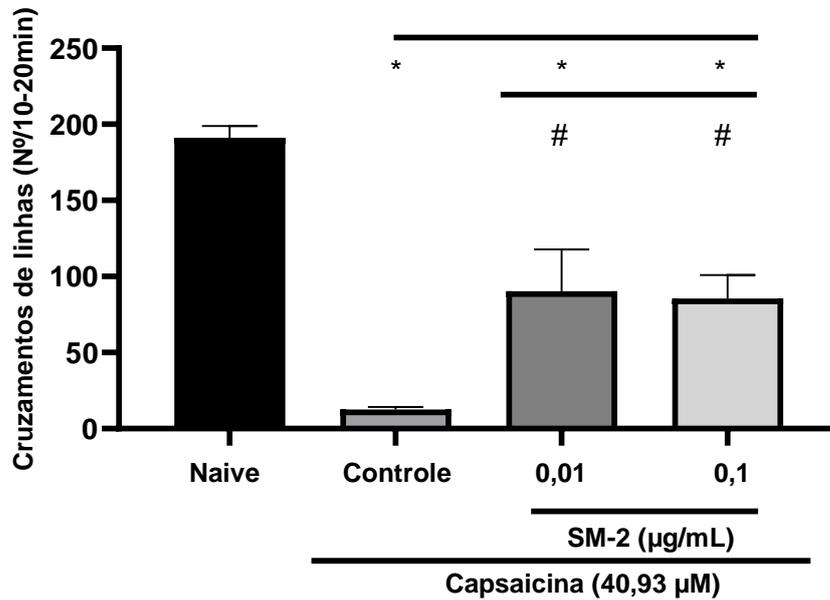


Os valores representam a média \pm erro padrão da média (EPM) para animais/grupo. Naive: grupo não tratado. Controle: veículo salina a 0,9%. Teste de ANOVA seguido de Tukey. Fonte: Autor

6.2 Efeito antinociceptivo orofacial do SM-2 no teste da capsaicina em zebrafish adulto.

SM-2 inibiu a nocicepção orofacial induzida por capsaicina conforme pode ser observado na figura 5. A resposta nociceptiva no grupo controle ($12,50 \pm 1,842$) foi significativamente maior ($p < 0,0001$) do que no grupo naive ($191,1 \pm 7,816$). Os animais tratados com SM-2 nas doses de 0,01 $\mu\text{g/mL}$ ($90,38 \pm 27,46$) ($p < 0,0099$) e 0,1 $\mu\text{g/mL}$ ($85,57 \pm 15,27$) ($p < 0,0214$) mostraram redução estatisticamente significante do comportamento nociceptivo através do aumento do número de cruzamento de linhas, em relação ao grupo controle.

Figura 6. Efeito do SM-2 sobre a nocicepção orofacial induzida por capsaicina em zebrafish adulto.

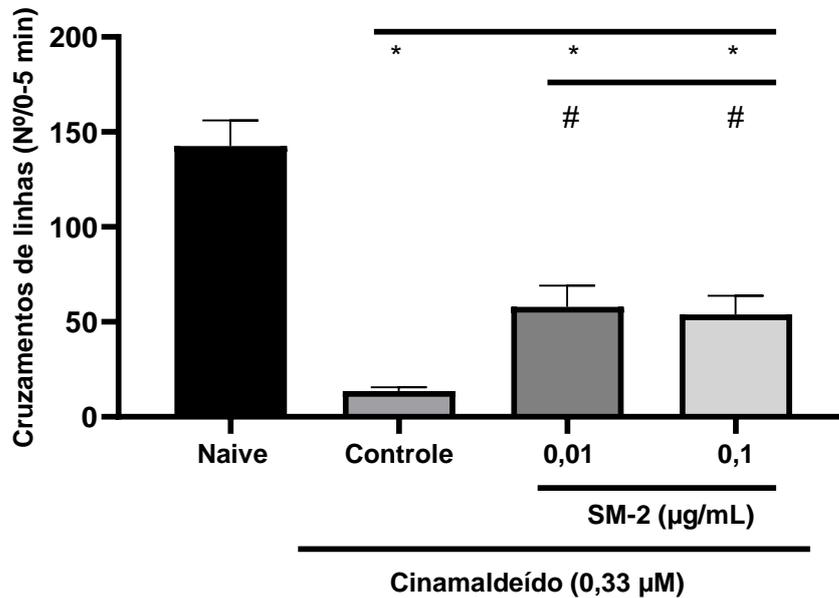


Os valores representam a média \pm erro padrão da média (EPM) para animais/grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo naive. # $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. Controle: veículo salina a 0,9%. Teste de ANOVA seguido de Tukey. Fonte: Autor

6.3 Efeito antinociceptivo orofacial do SM-2 no teste de cinamaldeído em zebrafish adulto.

SM-2 inibiu a nocicepção orofacial induzida por cinamaldeído em zebrafish adulto conforme pode ser observado na figura 6. Além disso, a resposta nociceptiva no grupo controle ($13,63 \pm 1,972$) foi significativamente maior ($p < 0,0001$) do que no grupo naive ($142,6 \pm 13,53$). Os animais tratados com SM-2 nas doses de $0,01 \mu\text{g/mL}$ ($57,88 \pm 11,15$) ($p < 0,0220$) e $0,1 \mu\text{g/mL}$ ($53,88 \pm 9,931$) ($p < 0,0418$) mostraram redução estatisticamente significativa do comportamento nociceptivo através do aumento do número de cruzamento de linhas, em relação ao grupo controle.

Figura 7. Efeito do SM-2 sobre a nocicepção orofacial induzida por cinamaldeído em zebrafish adulto.

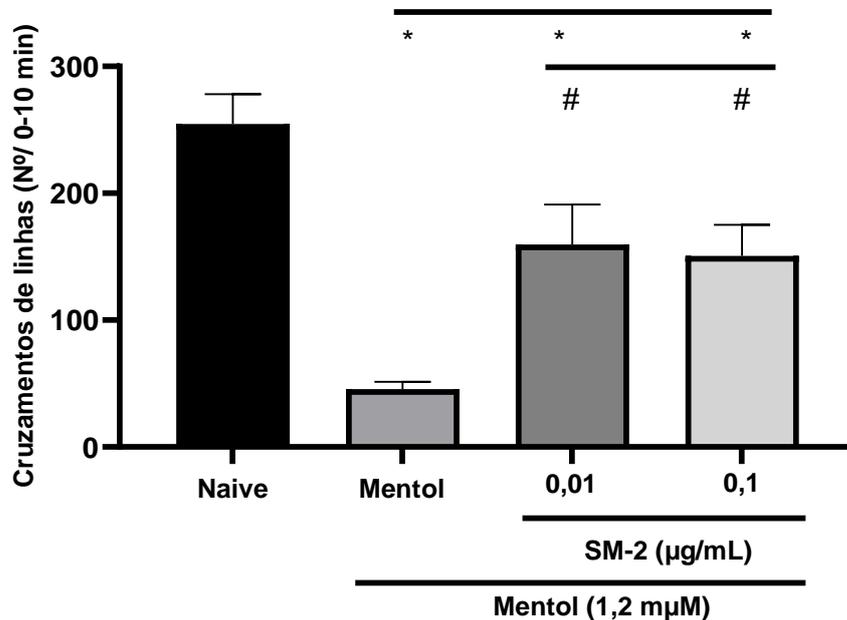


Os valores representam a média \pm erro padrão da média (EPM) para animais/grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo naive. # $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. Controle: veículo salina a 0,9%. Teste de ANOVA seguido de Tukey. Fonte: Autor

6.4 Efeito antinociceptivo orofacial do SM-2 no teste do mentol em zebrafish adulto.

SM-2 inibiu a nocicepção orofacial induzida por mentol em zebrafish adulto conforme pode ser observado na figura 7. A resposta nociceptiva do grupo controle ($45,50 \pm 5,794$) foi significativamente maior ($p < 0,0001$) do que no grupo naive ($254,5 \pm 23,53$). Os animais tratados com SM-2 nas doses de $0,01 \mu\text{g/mL}$ ($159,7 \pm 31,48$) ($p < 0,0087$) e $0,1 \mu\text{g/mL}$ ($150,6 \pm 24,53$) ($p < 0,0130$) mostraram redução estatisticamente significativa do comportamento nociceptivo através do aumento do número de cruzamento de linhas, em relação ao grupo controle.

Figura 8. Efeito do SM-2 sobre a nociceção orofacial induzida por mentol em zebrafish adulto.

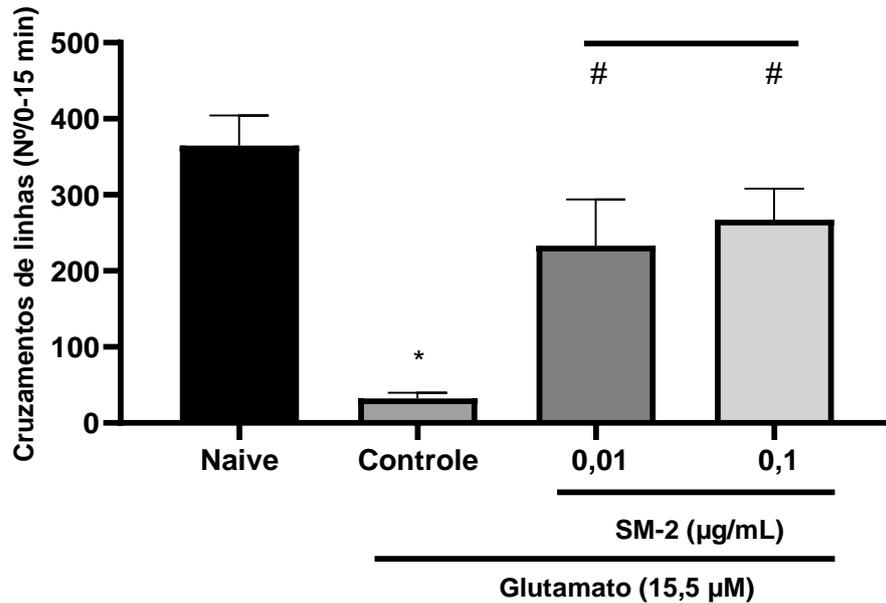


Os valores representam a média \pm erro padrão da média (EPM) para animais/grupo. * $p < 0,05$ do grupo naive. # $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. Controle: veículo salina a 0,9%. Teste de ANOVA seguido de Tukey.
Fonte: Autor

6.5 Efeito antinociceptivo orofacial do SM-2 no teste do glutamato em zebrafish adulto.

SM-2 inibiu a nociceção orofacial induzida por glutamato em zebrafish adulto conforme pode ser observado na figura 8. A resposta nociceptiva no grupo controle ($32,38 \pm 7,253$) foi significativamente maior ($p < 0,0001$) do que no grupo naive ($364,9 \pm 39,50$). Os animais tratados com SM-2 nas doses de $0,01 \mu\text{g/mL}$ ($233,3 \pm 60,87$) ($p < 0,0105$) e $0,1 \mu\text{g/mL}$ ($267,3 \pm 41,02$) ($p < 0,024$) mostraram redução estatisticamente significativa da resposta nociceptiva através do aumento do número de cruzamento de linhas, em relação ao grupo controle. Diferente dos demais experimentos, o SM-2 mostrou-se igual ao grupo naive.

Figura 9. Efeito do SM-2 sobre a nociceção orofacial induzida por glutamato em zebrafish adulto.

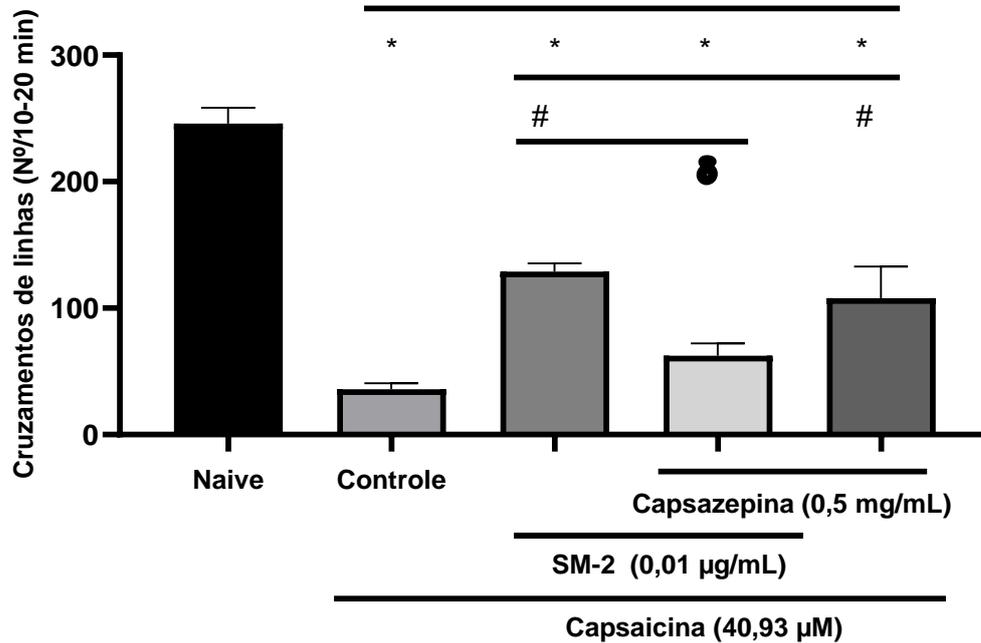


Os valores representam a média \pm erro padrão da média (EPM) para animais/grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo naive. # $p < 0,05$ em relação a grupo controle. Controle: veículo salina a 0,9%. Teste de ANOVA seguido de Tukey. Fonte: Autor

6.6 Efeito da capsazepina sobre a atividade antinociceptiva de SM-2 no modelo de nociceção orofacial induzida por capsaicina em zebrafish adulto.

A administração de SM-2 0,01 $\mu\text{g/mL}$ ($128,9 \pm 6,555$) foi capaz de reduzir o comportamento nociceptivo ($p < 0,006$) induzido por capsaicina, quando comparado ao grupo controle ($35,75 \pm 4,810$). O efeito antinociceptivo do SM-2 0,01 $\mu\text{g/mL}$ ($62,43 \pm 9,710$), quando co-administrado com a capsazepina, foi significativamente maior ($p < 0,0270$) quando comparado ao grupo SM-2 0,01 $\mu\text{g/mL}$ ($128,9 \pm 6,555$), percebendo-se reversão do efeito antinociceptivo de SM-2 (Figura 9). O resultado do comportamento nociceptivo do grupo capsazepina + capsaicina ($107,8 \pm 25,15$) foi significativamente menor ($p < 0,0076$) quando comparado ao grupo controle ($35,75 \pm 4,810$), sendo similar ao grupo SM-2. Dessa forma, o efeito antinociceptivo de SM-2 é modulado pela via do canal TRPV1.

Figura 10. Efeito da capsazepina sobre a resposta antinociceptiva de SM-2 na nocicepção orofacial induzida por capsaicina em zebrafish adulto.

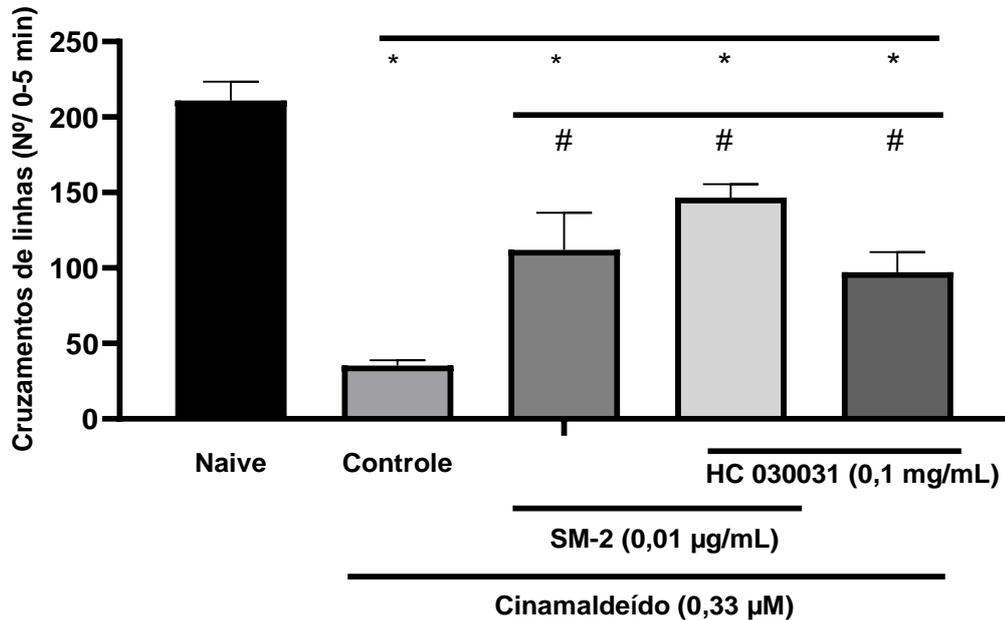


O pré-tratamento com capsazepina (0,5 mg/mL) reverteu o efeito de SM-2. Os valores representam a média \pm erro padrão da média (EPM) para animais/grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo naive. # $p < 0,05$ relação ao grupo controle. Controle: veículo salina a 0,9%. Teste de ANOVA seguido de Tukey. Fonte: Autor

6.7 Efeito do HC-030031 sobre a atividade antinociceptiva de SM-2 no modelo de nocicepção orofacial induzida por cinamaldeído em zebrafish adulto.

A administração de SM-2 0,01 $\mu\text{g/mL}$ ($111,9 \pm 24,69$) foi capaz de reduzir o comportamento nociceptivo ($p < 0,4849$) induzido por cinamaldeído, quando comparado ao grupo controle ($35,85 \pm 3,500$). O efeito antinociceptivo de SM-2 0,01 $\mu\text{g/mL}$, quando co-administrado com HC-030031 0,1 mg/mL ($146,6 \pm 8,928$), não foi alterado ($p < 0,4849$) comparado ao grupo SM-2 0,01 $\mu\text{g/mL}$ ($111,9 \pm 24,69$) (Figura 10). Além disso, a resposta nociceptiva de HC-030031 ($97,13 \pm 13,37$) foi significativamente menor ($p < 0,0363$) quando comparada ao grupo controle ($35,38 \pm 3,500$), sendo similar ao grupo SM-2. Esse resultado sugere que o efeito de SM-2 não depende, pelo menos em parte, da via do canal TRPA1.

Figura 11. Efeito do HC 030031 sobre a resposta antinociceptiva de SM-2 na nocicepção orofacial induzida por cinamaldeído em zebrafish adulto.

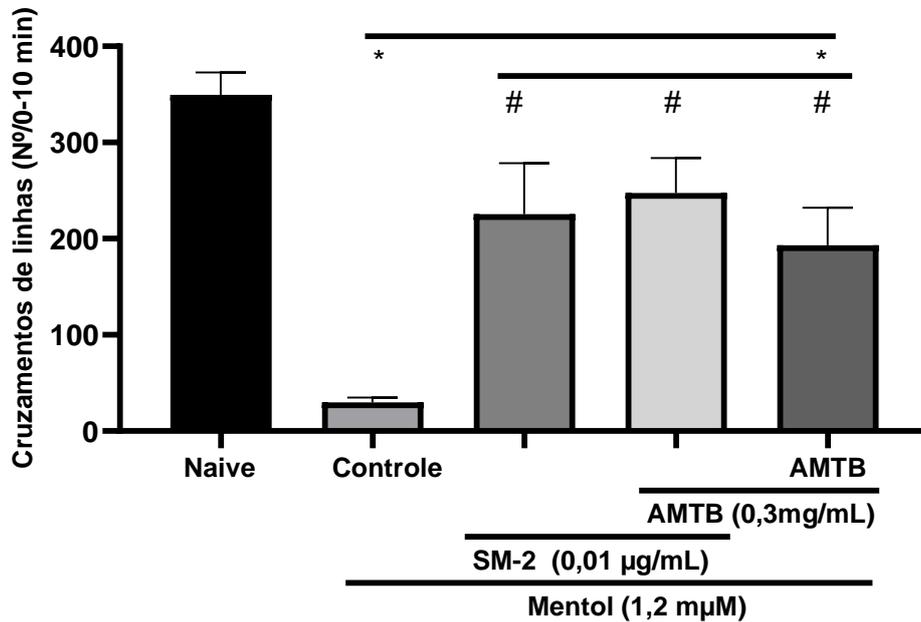


O pré-tratamento com HC 030031 (0,1 mg/mL) não reverteu o efeito de SM-2. Os valores representam a média \pm erro padrão da média (EPM) para animais/grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo naive. # $p < 0,05$ relação ao grupo controle. Controle: veículo salina a 0,9%. Teste de ANOVA seguido de Tukey. Fonte: Autor.

6.8 Efeito do AMTB sobre a atividade antinociceptiva de SM-2 no modelo de nocicepção orofacial induzida por mentol em zebrafish adulto.

A administração de SM-2 0,01 µg/mL ($225,5 \pm 53,14$) foi capaz de reduzir o comportamento nociceptivo ($p < 0,0034$) induzido por mentol quando comparado ao grupo controle ($29,75 \pm 5,140$). O efeito antinociceptivo orofacial do SM-2 0,01 µg/mL, quando co-administrado com AMTB ($247,4 \pm 36,47$), não foi alterado ($p < 0,9493$) quando comparado ao grupo SM-2 0,01 µg/mL ($225,5 \pm 53,14$), conforme pode ser verificado na figura 11. Além disso, a administração de AMTB ($193,0 \pm 39,18$) reduziu ($p < 0,0191$) a resposta nociceptiva em relação ao grupo controle ($29,75 \pm 5,140$). Esse resultado sugere que o efeito de SM-2 não depende, pelo menos em parte, da via do canal TRPM8.

Figura 12. Efeito do AMTB sobre a resposta antinociceptiva de SM-2 na nocicepção orofacial induzida por Mentol em zebrafish adulto.

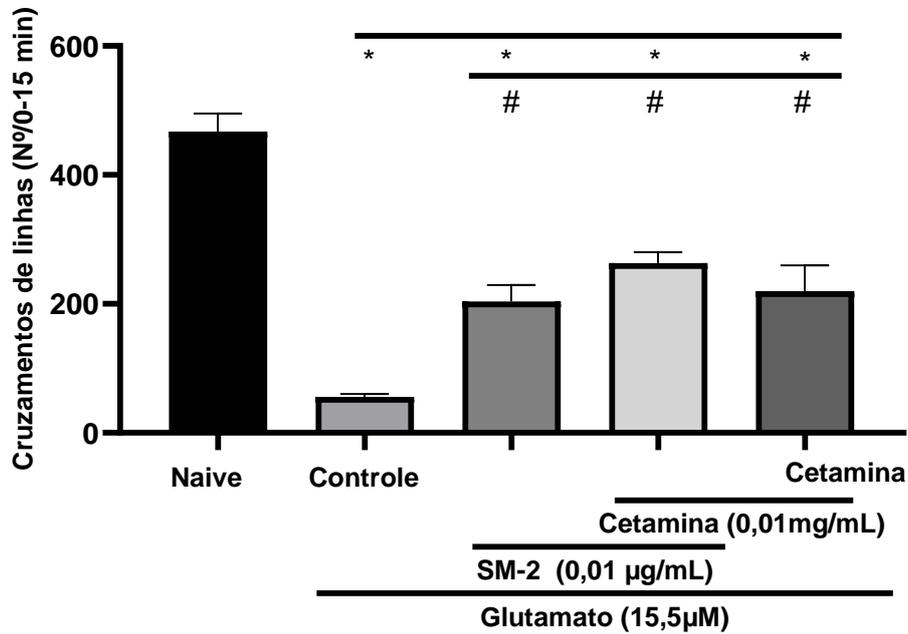


O pré-tratamento com AMTB não reverteu o efeito antinociceptivo de SM-2. Os valores representam a média \pm erro padrão da média (EPM) para animais/grupo. * $p < 0,05$ em relação ao naive. # $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. Controle: veículo salina a 0,9%. Teste de ANOVA seguido de Tukey. Fonte: Autor

6.9 Efeito da cetamina sobre a atividade antinociceptiva de SM-2 no modelo de nocicepção orofacial induzida por glutamato em zebrafish adulto.

A administração de SM-2 0,01 $\mu\text{g/mL}$ ($203,8 \pm 25,53$) foi capaz de reduzir o comportamento nociceptivo ($p < 0,0024$) induzido por cetamina quando comparado ao grupo controle ($55,63 \pm 4,440$). O efeito antinociceptivo orofacial do SM-2 0,01 $\mu\text{g/mL}$, quando co-administrado com cetamina ($263,1 \pm 17,15$), não foi alterado ($p < 0,4959$) em relação ao grupo SM-2 0,01 $\mu\text{g/mL}$ ($203,8 \pm 25,53$), conforme pode ser verificado na figura 12. Além disso, a administração de cetamina ($219,5 \pm 40,32$) reduziu significativamente ($p < 0,0007$) a resposta nociceptiva em relação ao grupo controle ($55,63 \pm 4,440$). Esse resultado sugere que o efeito de SM-2, pelo menos em parte, não depende da via do receptor NMDA.

Figura 13. Efeito da cetamina sobre a resposta antinociceptiva de SM-2 na nocicepção orofacial induzida por glutamato em zebrafish adulto.

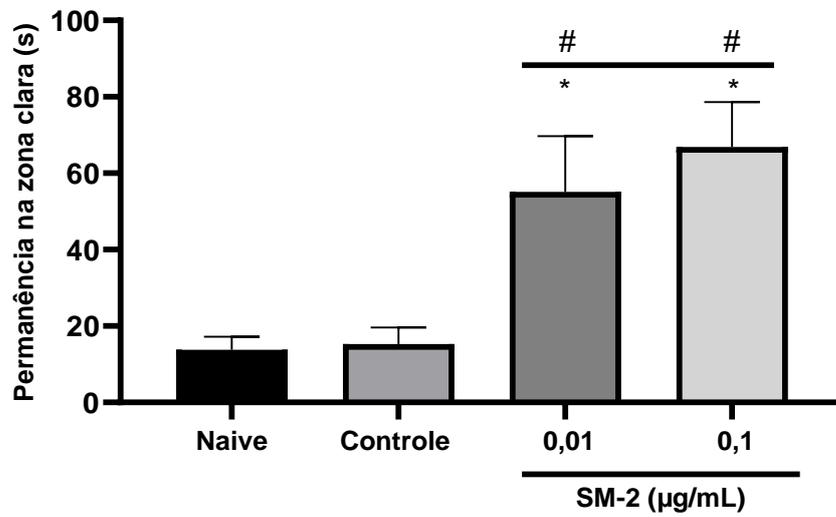


O pré-tratamento com cetamina não reverteu os efeitos antinociceptivo de SM-2. Os valores representam a média \pm erro padrão da média (EPM) para animais/grupo. * $p < 0,05$ em relação ao naive. # $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. Controle: veículo salina a 0,9%. Teste de ANOVA seguido de Tukey. Fonte: Autor

6.10 Avaliação da atividade ansiolítica de SM-2

SM-2 nas doses de 0,01 $\mu\text{g/mL}$ ($55,13 \pm 14,58$) ($p < 0,0276$) e ($p < 0,0355$) 0,1 $\mu\text{g/mL}$ ($66,88 \pm 11,79$) ($p < 0,0034$) e ($p < 0,0045$) foi capaz de aumentar o tempo de permanência do zebrafish adulto na porção clara do aquário quando comparados aos grupos naive ($13,75 \pm 3,452$) e controle ($15,25 \pm 4,354$), respectivamente, conforme pode ser observado na figura 13.

Figura 14. Avaliação a atividade ansiolítica de SM-2 em zebrafish adulto.



Os valores representam a média \pm erro padrão da média (EPM) para animais/grupo. * $p < 0,05$ em relação ao naive. # $p < 0,05$ em relação ao controle. Controle: veículo salina a 0,9%. Teste de ANOVA seguido de Tukey. Fonte: Autor

7 DISCUSSÃO

Este estudo mostrou o efeito antinociceptivo orofacial de SM-2 em modelo de zebrafish adulto, demonstrando, pela primeira vez, seu mecanismo de ação pela modulação do receptor TRPV1. Além disso, evidenciou-se que SM-2 não alterou a atividade motora dos animais, e demonstrou-se seu efeito ansiolítico.

Algumas plantas podem possuir um importante papel na medicina moderna. Os produtos naturais podem ser utilizados como base para obtenção de novos fármacos com atividade terapêutica importante. Além disso, os compostos naturais apresentaram componentes nos quais podem ser modificados quimicamente, tornando-os menos tóxicos. No Brasil, cerca de 82 % da população utiliza produtos à base de plantas medicinais nos seus cuidados com a saúde (Organization, 2019).

Nesse contexto de plantas medicinais, já é conhecida a utilização da *S. maritima* para diversas finalidades, como para tratar dor de estômago, hidropisia e inchaço, além de suas propriedades antivirais, citotóxica e larvicida (Rodrigues *et al.*, 2010). Além disso, alguns metabólitos da planta *S. maritima* demonstraram potencial efeito antioxidante (crenatosídeo) e antimicrobiano (estemodina e estemodinosídeo B) (Silva *et al.*, 2014). O estudo de Teixeira *et al.* (2017) comprovou que o extrato obtido das folhas de *S. maritima* foi capaz de reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias, o estresse oxidativo e a perda óssea alveolar em um modelo pré-clínico de periodontite.

Uma série de investigações sobre a *S. maritima* vem sendo realizada por nosso grupo de pesquisa. O efeito antinociceptivo e anti-inflamatório do extrato etanólico das folhas de *S. maritima* e estemodina foi comprovado em um modelo de hipernocicepção inflamatória aguda na ATM de ratos (Azevedo, 2019). O efeito antinociceptivo de SM-2, quando administrado tanto sistematicamente por via oral quanto localmente na ATM, em modelo induzido por formalina na ATM de ratos, também foi demonstrado (Fernandes, 2020). De forma a investigar a toxicidade do SM-2, foi realizado um estudo com camundongos, o qual demonstrou a segurança da substância (Alves, 2023). Em relação as concentrações das doses utilizadas, as concentrações das doses administrada em ratos foram necessárias para definir as concentrações para os modelos de nocicepção aguda em zebrafish.

Diferente dos ensaios pré-clínicos já realizados com ratos envolvendo o SM-2, nesse estudo optou-se por realizar a investigação com zebrafish adulto devido o modelo ser mais prático, com menos custo e eficiente, quando comparado a estudos com ratos (FUKUSHIMA *et al.*, 2020).Ademais, o uso de modelos experimentais de dor em zebrafish

adulto tem sido usado com sucesso de forma a compreender alterações moleculares, fisiológicas e comportamentais específicas após diferentes estímulos nocivos (Costa et al., 2021).

Uma série de investigações sobre *S. marítima* e os diterpenos semissintéticos deste, vem sendo realizada por nosso grupo. O efeito antinociceptivo e anti-inflamatório do extrato etanólico das folhas de *S. marítima* e estemodina foi comprovado em um modelo de hipernocicepção inflamatória aguda na ATM de ratos (Azevedo, 2019). O efeito antinociceptivo de SM-2, quando administrado tanto sistematicamente por via oral quanto localmente na ATM, em modelo induzido por formalina na ATM de ratos, também foi demonstrado (Fernandes, 2020) De forma a investigar a toxicidade do SM-2, foi realizado um estudo *in vivo* com camundongos, o qual demonstrou a segurança da substância (ALVES, 2023). As concentrações das doses usadas em ratos foram necessárias para definir as concentrações para os modelos de nocicepção aguda em zebrafish.

O teste de campo aberto é fundamental pois avalia se determinada substância causa alterações na atividade locomotora dos animais (Ahmad, 2013). No presente estudo, SM-2 não promoveu alterações na atividade locomotora de zebrafish adulto. Esses resultados corroboram com os achados na literatura na qual avaliou-se o efeito do SM-2 no teste de *rotarod* em ratos, a fim de avaliar se causaria letargia, sonolência ou relaxamento na musculatura ou desordem na coordenação motora (Fernandes, 2020). Foi demonstrado que SM-2 não causava nenhum tipo de alteração locomotora, tendo como parâmetros o tempo de latência e número de queda dos animais. Esses resultados mostram que o perfil analgésico do SM-2 não está relacionado a efeitos na coordenação motora

Diferente dos ensaios pré-clínicos já foram realizados com ratos envolvendo o SM-2, nesse estudo optou-se por realizar a investigação com zebrafish adulto devido o modelo ser mais prático, com menos custo e eficiente, quando comparado a estudos com ratos (Fukushima et al., 2020). Ademais, o uso de modelos experimentais de dor em zebrafish adulto tem sido usado com sucesso de forma a compreender alterações moleculares, fisiológicas e comportamentais específicas após diferentes estímulos nocivos (Costa et al., 2022)

Além disso, diferente das outras metodologias aplicadas em modelos de nocicepção em zebrafish, a forma de administração do SM-2 optada foi por via oral tendo como base os estudos previamente realizados com a substância supracitada (Alves, 2023; Fernandes, 2020) e também outro estudo em que o potencial antinociceptivo do ácido oleanólico foi investigado no modelo de zebrafish (soares et al., 2019).

Sobre o mecanismo de ação de SM-2, (Fernandes, 2020) observou que o efeito antinociceptivo de SM-2 não dependeu das vias da heme-oxigenase-1 (HO-1), do óxido nítrico

(NO) e da via opioide.(Alves, 2023)mostrou o efeito antineoplásico no câncer de língua dependia de TNF- α . Dados não publicados evidenciaram que SM-2, aplicado localmente na ATM, causou redução dos níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β em tecidos neurais periféricos e centrais. Nesse estudo, decidimos investigar o mecanismo de ação de SM-2 por meio de diferentes agentes nocivos e por receptores da família TRPs e NMDA.

Nessa perspectiva de elucidar o possível mecanismo de ação farmacológica de SM-2, descobrimos que o SM-2 inibe a nocicepção orofacial induzida por ativação dos receptores TRPV1, TRPA1, TRPM8 e NMDA no modelo de zebrafish. No entanto, quando usado o HC-030031 (antagonista de TRPA1), AMTB (antagonista de TRPM8) e cetamina (antagonista de NMDA), essas substâncias não foram capazes de reverter o efeito antinociceptivo de SM-2.

De fato, o potencial do cinamaldeído em ativar os receptores TRPA1 em zebrafish já havia sido explorado (LEITE *et al.*, 2022; SOARES; SANTOS; COELHO *et al.*, 2019). No presente estudo em zebrafish, o tratamento com SM-2 reduziu o comportamento nociceptivo induzido por cinamaldeído (agonista de TRPA1), entretanto esse efeito não foi revertido quando administrado o antagonista de TRPA1, HC 030031, indicando que o potencial antinociceptivo de SM-2 independe da via do receptor TRPA1.

Em relação ao receptor TRPM8, é conhecido que possui expressão em 5 a 10% dos neurônios dos gânglios da raiz dorsal e trigeminal e que são evocados por substâncias como o mentol (Babes, 2011; Bharate, 2012). No presente estudo em zebrafish, o tratamento com SM-2 reduziu o comportamento nociceptivo induzido por mentol (antagonista de TRPM8), entretanto esse efeito não foi revertido quando administrado AMTB (antagonista do TRPM8), indicando que o potencial antinociceptivo de SM-2 independe, pelo menos em parte, da via do receptor TRPM8.

Os receptores NMDA centrais já foram expressos em zebrafish, e esses animais são muito sensíveis a um grande espectro de antagonistas de NMDA, incluindo a cetamina (KYZAR; KALUEFF, 2016). Um estudo já demonstrou o efeito da cetamina na potencialização da analgesia e na redução de efeitos colaterais causados por opioides, por exemplo (Suzuki, 2009).Nesse estudo em zebrafish, o pré-tratamento com cetamina (agonista de NMDA) não reverteu o efeito antinociceptivo de SM-2, indicando que o potencial antinociceptivo de SM-2 independe, pelo menos em parte, da via do receptor NMDA.

Por outro lado, quando utilizado o antagonista do receptor TRPV1 (capsazepina), foi observada reversão do efeito antinociceptivo do SM-2. Dessa forma, o presente estudo é o primeiro a elucidar o mecanismo de ação de SM-2 na dor orofacial através do receptor TRPV1. De fato, o envolvimento de SM-2 com receptores TRPV1 foi corroborado em estudo prévio

utilizando docking molecular, o qual indicou a existência de uma interação entre o SM-2 e receptores TRPV1, que se deve à afinidade de ligação do SM-2 a esse receptor (ALVES, 2023). Com base nesses achados, é válido afirmar que o efeito antinociceptivo orofacial do SM-2 pode estar fortemente associado à modulação do receptor TRPV1.

Explorar drogas que atuem bloqueando os canais TRPV1 já vem sendo investigado há algum tempo (Carnevale, 2016; Kang *et al.*, 2017) devido às diversas funções reguladas por esse canal. TRPV1 é um canal não seletivo permeável ao cálcio, o qual é controlado por estímulos físicos e químicos (Nikolaeva Koleva *et al.*, 2021) Seu papel no sistema nervoso central é conhecido por envolver o processamento e modulação da dor. Haja vista que esse receptor é responsável pela detecção e transmissão da dor aguda e crônica, substâncias que modulem a atividade desse receptor apresentam um potencial clínico para o tratamento da dor. No estudo de Santos *et al.*, 2022, observou-se que o pré-tratamento com citral levou a uma resposta antinociceptiva em ratos, e esse efeito é bloqueado quando o antagonista do canal TRPV1 é administrado, corroborando o entendimento sobre o potencial farmacológico desses potenciais fármacos de atuar nessa via.

Já foi demonstrado que os antagonistas do receptor TRPV1 apresentam um grande potencial antinociceptivo, em diferentes modelos de dor em animais, tanto em dores inflamatórias crônicas quanto de origem neuropática, bem como sua participação já foi demonstrada no processo de integração e transmissão espinhal da dor (caterina *et al.*, 2000) Uma vez sensibilizado, o receptor TRPV1 possibilita o influxo de íons, principalmente íons cálcio, e esse influxo é propagado por meio da fibra e pode ser traduzido como dor no sistema nervoso central (Urtado, 2008).

Em relação à dor orofacial, já existem estudos abordando sobre o potencial dos receptores TRPs participarem da regulação da dor na ATM (Luo *et al.*, 2021). Foi demonstrado que a injeção de capsaicina (agonista de TRPV1) no músculo masseter produziu respostas nocifensivas e hiperalgesia mecânica em ratos (RO, 2009). Esse estudo demonstrou que esse canal expresso em aferentes musculares podem contribuir na dor do músculo masseter. Utilizando o modelo de inflamação do músculo masseter induzido por CFA, foi fornecido evidências que a hiperalgesia mecânica do músculo masseter foi atenuada pelo bloqueio de TRPV1 ou TRPA1 (Chung, 2016; Niu, 2011), e que o bloqueio duplo de TRPV1 e TRPA1 produziu um efeito maior na redução de dor espontânea, indicando que esses dois receptores contribuem na dor espontânea (Wang *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2017).

Sabendo que o comportamento natural do zebrafish é preferir regiões escuras, baseada na aversão a regiões claras (Magalhães *et al.*, 2017) e com base nos resultados

apresentados, percebe-se que o SM-2 reduziu a ansiedade dos animais, tendo em vista que, após a administração do composto, os peixes aumentaram o tempo de permanência na região clara do aquário, demonstrando dessa forma, um interessante potencial ansiolítico de SM-2.

Um dos pontos fortes do estudo foi a descoberta do mecanismo de ação do SM-2 através de canais TRPV1, até então conhecido apenas através da redução das citocinas TNF α e IL-1 β . Apesar do baixo nível de consanguinidade que também representar uma limitação na análise do comportamento, a maioria dos testes comportamentais realizados em ratos tem atualmente um teste comparável que pode ser realizado no zebrafish (Vaz, 2019). Também há uma abordagem inovadora para estudo da dor orofacial e relevância clínica pois os receptores TRPV1, TRPA1, TRPM8 e NMDA são alvos potenciais para o desenvolvimento de novas terapias analgésicas;

Uma das limitações é a falta de compreensão a partir de qual mecanismo ocorre a interação entre o SM-2 e o canal TRPV1, podendo ser fruto de estudo futuros envolvendo, inclusive, o sistema endocanabinoide, pois se sabe que o TRPV1 faz parte da família do sistema endocanabinoide. Um estudo recente demonstrou o envolvimento de TRPV1 com o sistema endocanabinoide, evidenciando a co-localização de receptores TRPV1 e CB-1 no mesmo neurônio (Carletti *et al.*, 2017). Dessa forma, este estudo também serve como um direcionamento para investigações futuras do SM-2 na dor crônica e o envolvimento do sistema endocanabinoide no efeito de SM-2. Ademais, a despeito da elevada sensibilidade do zebrafish a vários estímulos nocivos e o que o torna o modelo bem versátil para estudo da dor, algumas limitações devem ser ponderadas, como por exemplo, as diferenças substanciais na complexidade do cérebro quando comparado com o cérebro de mamíferos ou humano é uma limitação.

8 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou o efeito analgésico de SM-2 em modelo de nocicepção orofacial induzida por substâncias algogênicas em modelo de zebrafish adulto. Além disso, descobriu-se que essa analgesia é modulada pelos canais TRPV1. Ademais, o composto também foi capaz de reduzir a ansiedade dos animais. Esses achados corroboram com o potencial farmacológico de SM-2 para o tratamento da dor orofacial.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, F.; RICHARDSON, M. K. Exploratory behaviour in the open field test adapted for larval zebrafish: impact of environmental complexity. **Behavioural processes**, 92, 2013.
- ALAWI, K. M.; AUBDOOL, A. A.; LIANG, L.; WILDE, E. The sympathetic nervous system is controlled by transient receptor potential vanilloid 1 in the regulation of body temperature. **The FASEB Journal**, 29, n. 10, 2015.
- ALMEIDA, M. M. **Efeitos cardiovasculares induzidos pelo óleo essencial de mentha x-villosa hudson (oemv), rotundifolona e mentol em ratos espontaneamente hipertensos – o papel dos canais potencial**. 2015. 237 f. (Dissertação de Mestrado) -, Universidade Federal da Paraíba.
- ALVES, M. G. **Estudo da toxicidade, docking molecular e efeito do sm-2 em modelo pré-clínico no câncer de língua em camundongos**. 2023. 70 f. Dissertação -, Universidade Federal do Ceará.
- ANDRADE, E.; LUIZ, A.; FERREIRA, J.; CALIXTO, J. Pronociceptive response elicited by TRPA1 receptor activation in mice. **Neuroscience**, 152, n. 2, 2008.
- APKARIAN, A. Nociception, Pain, Consciousness, and Society: A Plea for Constrained Use of Pain-related Terminologies. **Journal of Pain**, 19, n. 11, 2018.
- ARAÚJO, D. S. M. D.; NASSINI, R.; PIERANGELO, G. D.; LOGU, F. D. TRPA1 as a therapeutic target for nociceptive pain. **Expert opinion on therapeutic targets**, 24, n. 10, 2020.
- ASGAR, J.; ZHANG, Y.; SALOMAN, J. L.; WANG, S. *et al.* The role of TRPA1 in muscle pain and mechanical hypersensitivity under inflammatory conditions in rats. **Neuroscience**, 310, 2015.
- AZEVEDO, J. L. M. **Efeito do extrato etanólico das folhas da Stemodia maritima Linn. e do diterpeno estemodina em modelos de hipernociceção inflamatória aguda na articulação temporomandibular de ratos**. 2019. 85 f. (Dissertação de mestrado) -, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza Disponível em: <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/42968>.
- BABES, A.; CIOBANU, A. C.; NEACSU, C.; BABES, R.-M. TRPM8, a sensor for mild cooling in mammalian sensory nerve endings. **Current pharmaceutical biotechnology**, 12, n. 1, 2011.
- BADEL, T.; ZADRAVEC, D.; KES, V. B.; SMOLJAN, M. *et al.* OROFACIAL PAIN – DIAGNOSTIC AND THERAPEUTIC CHALLENGES. **Acta Clinica Croatica**, 58, n. Suppl 1, 2019.
- BARROS, A. R. C.; SANTOS, S. A. A. R.; MATIAS, B. B.; VIEIRA-NETO, A. E. Carvedilol Repurposing in Orofacial Pain: Preclinical Findings in Adult Zebrafish. **The FASEB Journal**, 33, n. S1, 2019.

BAUER, B.; MALLY, Â.; LIEDTKE, D. Zebrafish Embryos and Larvae as Alternative Animal Models for Toxicity Testing. **International journal of molecular sciences**, 22, n. 24, 2021.

BEHRENDT, M. Transient receptor potential channels in the context of nociception and pain – recent insights into TRPM3 properties and function. **Biological chemistry**, 400, n. 7, 2019.

BENOLIEL, R.; SVENSSON, P.; EVERS, S.; WANG, S.-J. *et al.* The IASP classification of chronic pain for ICD-11: chronic secondary headache or orofacial pain. **Pain**, 160, n. 1, 2019.

BHARATE, S. S.; BHARATE, S. B. Modulation of thermoreceptor TRPM8 by cooling compounds - PubMed. **ACS chemical neuroscience**, 3, n. 4, 2012.

CALIXTO, J. B.; KASSUYA, C. A.; ANDRÉ, E.; FERREIRA, J. Contribution of natural products to the discovery of the transient receptor potential (TRP) channels family and their functions **Pharmacology & therapeutics**, 106, n. 2, 2005.

CARLETTI, F.; GAMBINO, G.; RIZZO, V.; FERRARO, G. Neuronal nitric oxide synthase is involved in CB/TRPV1 signalling: Focus on control of hippocampal hyperexcitability. **Epilepsy Research**, 138, 2017.

CARNEVALE, V.; ROHACS, T. TRPV1: A Target for Rational Drug Design. **Pharmaceuticals 2016, Vol. 9, Page 52**, 9, n. 3, 2016.

CARO, C. D.; RUSSO, R.; AVAGLIANO, C.; CRISTIANO, C. Antinociceptive effect of two novel transient receptor potential melastatin 8 antagonists in acute and chronic pain models in rat. **British journal of pharmacology**, 175, n. 10, 2018.

CARR, D. B. "Pain Is a Public Health Problem" --What Does That Mean and Why Should We Care? - PubMed. **Pain medicine (Malden, Mass.)**, 17, n. 4, 2016.

CARRARA, S. V.; CONTI, P. C. R.; BARBOSA, J. S. Termo do 1º Consenso em Disfunção Temporomandibular e Dor Orofacial. **Dental Press Journal of Orthodontics**, 15, n. 3, 2010.

CATERINA, M.; LEFFLER, U.; MALMBERG, A.; MARTIN, W. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor - PubMed. **Science (New York, N.Y.)**, 288, n. 5464, 2000.

CAVALCANTE, S. K. S.; LINHARES, N. P.; DE FÁTIMA, N. P.; COUTO, A. Abordagem terapêutica multidisciplinar para o tratamento de dores orofaciais: Uma revisão de literatura / Multidisciplinary therapeutic approach for the treatment of orofacial pain: A literature review. **Brazilian Journal of Development**, 6, n. 7, 2020.

CHOI, T.-Y.; CHOI, T.-I.; LEE, Y.-R.; CHOE, S.-K. *et al.* Zebrafish as an animal model for biomedical research. **Experimental and Molecular Medicine**, 53, n. 3, 2021.

CHUNG, M.-K.; PARK, J.; ASGAR, J.; RO, J. Y. Transcriptome analysis of trigeminal ganglia following masseter muscle inflammation in rats. **Molecular pain**, 12, n. 0, 2016.

CHUNG, M.-K.; RO, J. Y. Peripheral glutamate receptor and transient receptor potential channel mechanisms of craniofacial muscle pain. **Molecular pain**, 16, 2020.

COSTA, F. V.; ROSA, L. V.; QUADROS, V. A.; ABREU, M. S. D. The Use of Zebrafish as a Non-traditional Model Organism in Translational Pain Research: The Knowns and the Unknowns. **Current neuropharmacology**, 20, n. 3, 2022.

DAI, Y.-J.; JIA, Y.-F.; CHEN, N.; BIAN, W.-P. *et al.* Zebrafish as a model system to study toxicology. **Environmental toxicology and chemistry**, 33, n. 1, 2014.

DALEWSKI, B.; KAMIŃSKA, A.; SZYDŁOWSKI, M.; KOZAK, M. Comparison of Early Effectiveness of Three Different Intervention Methods in Patients with Chronic Orofacial Pain: A Randomized, Controlled Clinical Trial. **Pain Research and Management**, 2019, n. 1, 2019.

DUBIN, A. E.; PATAPOUTIAN, A. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. **The Journal of Clinical Investigation**, 120, n. 11, 2010.

FEIZERFAN, A.; SHEH, G. Transition from acute to chronic pain. **Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain**, 2015.

FERNANDES, M. E. F. **Estudo dos derivados semi-sintéticos sm-2 e sm-3 obtidos de stemodia maritima linn. em ensaio pré – clínico na atm de ratos.** 2020. 78 f. (Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde)) -, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Campus de Sobral, Universidade Federal do Ceará Disponível em: <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/67778>.

FILLINGIM, R. B. Individual Differences in Pain: Understanding the Mosaic that Makes Pain Personal. **Pain**, 158, n. Suppl 1, 2017.

FINNERUP, N. B.; KUNER, R.; JENSEN, T. S. Neuropathic Pain: From Mechanisms to Treatment. **Physiological Reviews**, 101, n. 1, 2020.

FITZCHARLES, M.-A.; COHEN, S. P.; CLAUW, D. J.; LITTLEJOHN, G. Nociceptive pain: towards an understanding of prevalent pain conditions - PubMed. **Lancet (London, England)**, 397, n. 10289, 2021.

FUKUSHIMA, H.; BAILONE, R. L.; BAUMGARTNER, I.; BORRA, R. C. Potenciais usos do modelo animal Zebrafish *Danio rerio* em pesquisas na Medicina Veterinária. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, 18, n. 1, 2020.

GAU, P.; POON, J.; UFRET-VINCENTY, C.; SNELSON, C. D.. The zebrafish ortholog of TRPV1 is required for heat-induced locomotion. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, 33, n. 12, 2013.

GONZÁLEZ-MUÑIZ, R.; BONACHE, M. A.; MARTÍN-ESCURA, C.; GÓMEZ-MONTERREY, I. Recent Progress in TRPM8 Modulation: An Update. **International journal of molecular sciences**, 20, n. 11, 2019.

GREENBAUM, T.; EMODI-PERLMAN, A. Headache and orofacial pain: A traffic-light prognosis-based management approach for the musculoskeletal practice - PubMed. **Frontiers in neurology**, 14, 2023.

GUALDANI, R.; CERUTI, S.; MAGNI, J.; MERLI, D. *et al.* Lipoic-based TRPA1/TRPV1 antagonist to treat orofacial pain - PubMed. **ACS chemical neuroscience**, 6, n. 3, 2015.

HÄGGMAN-HENRIKSON, B.; LIV, P.; ILGUNAS, A.; VISSCHER, C. *et al.* Increasing gender differences in the prevalence and chronification of orofacial pain in the population. **Pain**, 161, n. 8, 2020.

HARGREAVES, K.; RUPAREL, S. Role of Oxidized Lipids and TRP Channels in Orofacial Pain and Inflammation - PubMed. **Journal of dental research**, 95, n. 10, 2016.

HORST, O. V.; CUNHA-CRUZ, J.; ZHOU, L.; MANNING, W. Prevalence of pain in the orofacial regions in patients visiting general dentists in the Northwest Practice-based REsearch Collaborative in Evidence-based DENTistry research network - PubMed. **Journal of the American Dental Association (1939)**, 146, n. 10, 2015.

HOSSAIN, M. Z.; BAKRI, M. M.; YAHYA, F.; ANDO, H. The Role of Transient Receptor Potential (TRP) Channels in the Transduction of Dental Pain. **International journal of molecular sciences**, 20, n. 3, 2019.

HOWE, K.; CLARK, M. D.; TORROJA, C. F.; TORRANCE, J.. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, 496, n. 7446, 2013.

HUANG, D.; LI, S.; DACA, A.; M, H. D. G. *et al.* Expression of the transient receptor potential channels TRPV1, TRPA1 and TRPM8 in mouse trigeminal primary afferent neurons innervating the dura - PubMed. **Molecular pain**, 8, n. 1, 2012.

HWANG, S. J.; OH, J. M.; VALTSCHANOFF, J. G. Expression of the vanilloid receptor TRPV1 in rat dorsal root ganglion neurons supports different roles of the receptor in visceral and cutaneous afferents. **Brain Research**, 1047, n. 2, 2005.

IFTINCA, M.; DEFAYE, M.; ALTIER, C. TRPV1-Targeted Drugs in Development for Human Pain Conditions - PubMed. **Drugs**, 81, n. 1, 2021.

International Classification of Orofacial Pain, 1st edition (ICOP). **Cephalalgia : an international journal of headache**, 40, n. 2, 2020.

JANSEN, C.; SHIMODA, L.; KAWAKAMI, J.; L-ANGMycene and terpene regulation of TRPV1 - PubMed. **Channels (Austin, Tex.)**, 13, n. 1, 2019.

JD, L.; RD, T. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology - PubMed. **Pain**, 137, n. 3, 2008.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, 413, n. 6852, 2001.

- KANG, S. M.; HAN, S.; LEE, Y. M.; OH, J.-H. *et al.* A synthetic peptide blocking TRPV1 activation inhibits UV-induced skin responses. **Journal of dermatological science**, 88, n. 1, 2017.
- KHAN, A.; KHAN, S.; KIM, Y. S. Insight into Pain Modulation: Nociceptors Sensitization and Therapeutic Targets. **Current Drug Targets**, 20, n. 7, 2019.
- KNOWLTON, W. M.; BIFOLCK-FISHER, Â.; BATISTA, D. M.; MCKEMY, D. D. TRPM8, but not TRPA1, is required for neural and behavioral responses to acute noxious cold temperatures and cold-mimetics in vivo. **Pain**, 150, n. 2, 2010.
- KOIVISTO, A.; JALAVA, N.; BRATTY, R.; PERTOVAARA, A. TRPA1 Antagonists for Pain Relief. **Pharmaceuticals**, 11, n. 4, 2018.
- KUNER, R.; KUNER, T. Cellular Circuits in the Brain and Their Modulation in Acute and Chronic Pain - PubMed. **Physiological reviews**, 101, n. 1, 2021.
- KYZAR, E. J.; KALUEFF, A. V. Exploring Hallucinogen Pharmacology and Psychedelic Medicine with Zebrafish Models. **Zebrafish**, 13, n. 5, 2016.
- LAWRENCE, C. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. **Aquaculture**, 269, n. 1-4, 2007.
- LEEuw, R. **Orofacial pain: Guidelines for assessment, diagnosis, and management**. 2008.
- LEITE, G. D. O.; SANTOS, S. A. A. R.; SILVA, R. R. D. S.; TEIXEIRA, C. S. *et al.* Parkia platycephala Lectin (PPL) Inhibits Orofacial Nociception Responses via TRPV1 Modulation. **Molecules**, 27, n. 21, 2022.
- LEVANTI, M.; RANDAZZO, B.; E, V.; VIÑA, E. *et al.* Acid-sensing ion channels and transient-receptor potential ion channels in zebrafish taste buds - PubMed. **Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft**, 207, 2016.
- LIU, Y.-J.; LI, Y.-L.; ZHONG-HAN, P.; LIAO, H.-L. *et al.* NMDARs mediate peripheral and central sensitization contributing to chronic orofacial pain - PubMed. **Frontiers in cellular neuroscience**, 16, 2022.
- LUO, Y.; SUTTLE, A.; ZHANG, Q.; WANG, P. *et al.* Transient Receptor Potential (TRP) Ion Channels in Orofacial Pain - PubMed. **Molecular neurobiology**, 58, n. 6, 2021.
- MACPHERSON, L. J.; XIAO, B.; KWAN, K. Y.; PETRUS, M. J. *et al.* An Ion Channel Essential for Sensing Chemical Damage. **The Journal of Neuroscience**, 27, n. 42, 2007.
- MAGALHÃES, F. E. A.; SOUSA, C. Á. P. B. D.; SANTOS, S. A. A. R.; MENEZES, R. B. . Adult Zebrafish (*Danio rerio*): An Alternative Behavioral Model of Formalin-Induced Nociception. **Zebrafish**, 14, n. 5, 2017.
- MCNAMARA, C. R.; MANDEL-BREHM, J.; BATISTA, D. M.; SIEMENS, J. TRPA1 mediates formalin-induced pain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 104, n. 33, 2007.

MESSIAS, C. R.; CUNHA, F. A.; CREMASCO, G. D. S.; BAPTISTA, M. N. Dor crônica, depressão, saúde geral e suporte social em pacientes fibromiálgicos e oncológicos. **Revista Psicologia e Saúde**, 12, n. 4, 2020.

MIDDLETON, S. J.; BARRY, A.; COMINI, M.; LI, Y. *et al.* Studying human nociceptors: from fundamentals to clinic. **Brain**, 2021.

MOCCIA, F.; MONTAGNA, D. Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1) Channel as a Sensor of Oxidative Stress in Cancer Cells. **Cells**, 12, n. 9, 2023.

MORAN, M. M. TRP Channels as Potential Drug Targets. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, 58, n. Volume 58, 2018, 2018.

MORGAN, M.; NENCINI, S.; THAI, J.; IVANUSIC, J. J. TRPV1 activation alters the function of A δ and C fiber sensory neurons that innervate bone. **Bone**, 123, 2019.

NICHOLAS, M.; VLAEYEN, J. W. S.; RIEF, W.; BARKE, A. *et al.* The IASP classification of chronic pain for ICD-11: chronic primary pain - PubMed. **Pain**, 160, n. 1, 2019.

NIKOLAEVA KOLEVA, M.; BUTRON, L.; GONZÁLEZ RODRÍGUEZ, S.; DEVESA, I.A capsaicinoid-based soft drug, AG1529, for attenuating TRPV1-mediated histaminergic and inflammatory sensory neuron excitability. **Scientific Reports 2021 11:1**, 11, n. 1, 2021.

NIU, K.; SALOMÃO, J.; ZHANG, E.; RO, J. Sex differences in the contribution of ATP-sensitive K⁺ channels in trigeminal ganglia under an acute muscle pain condition. **Neuroscience**, 180, 2011.

NIX, W. A. Acute and chronic pain. **Muscles, Nerves, and Pain**, 2017.

OLIVEIRA, B. D. D.; SANTOS, S. A. A. R.; PEREIRA, E. W. M.; NOGUEIRA, A. B. *et al.* Orofacial Antinociceptive Effect of Nifedipine in Rodents Is Mediated by TRPM3, TRPA1, and NMDA Processes. **Journal of Oral and Facial Pain and Headache**, 34, n. 2, 2020.

ORGANIZATION, W. H. **WHO global report on traditional and complementary medicine**. 2019. 978-92-4-151543-6.

OUANOUNOU, A.; GOLDBERG, M.; HAAS, D. A. Pharmacotherapy in Temporomandibular Disorders: A Review. **Canadian Dental Association**, 83, 2017.

PARISI, J. R. **Participação dos receptores de potencial transiente vanilóide do tipo 1 (TRPV1) no controle da dor neuropática**. 2016. 60 f. (Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicada à Saúde) -, Universidade Federal de Alfenas.

PATRÍCIO, K. P.; MINATO, A. C. D. S.; BROLIO, A. F.; LOPES, M. A. Medicinal plant use in primary health care: an integrative review. **Ciência & Saúde Coletiva**, 27, n. 2, 2022.

PEIER, A. M.; MOQRICH, A.; HERGARDEN, A. C.; REEVE, A. J. A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. **Cell**, 108, n. 5, 2002.

PEREIRA, W. B. **Relação dos canais iônicos receptores de potencial transitório (TRP) e a dor: uma revisão.** 2014. - Disponível em: <https://repositorio.ufpb.br/jspui/handle/123456789/550>.

PIOVESAN, E. J.; RANDUNZ, V.; UTIUMI, M.; LANGE, M. C Influence of NMDA and non-NMDA antagonists on acute and inflammatory pain in the trigeminal territory: a placebo control study. **Arquivos de neuro-psiquiatria**, 66, n. 4, 2008.

POONAM, P.; SUDIP, P.; STEFANO, D. A. The Influence of Environmental Conditions on Secondary Metabolites in Medicinal Plants: A Literature Review - PubMed. **Chemistry & biodiversity**, 18, n. 11, 2021.

RAHARDIAN, M. K.; PUTRI, F. A.; MAULINA, T. Association Between Orofacial Pain and Anxiety: A Systematic Review. **Journal of Pain Research**, Volume 17, 2024.

RAJA, S. N.; CARR, D. B.; COHEN, M.; FINNERUP, N. B. *et al.* The Revised IASP definition of pain: concepts, challenges, and compromises. **Pain**, 161, n. 9, 2020.

RIEDEL, O.; NEECK, G. Nociception, pain, and antinociception: current concepts. **Zeitschrift fur Rheumatologie**, 60, n. 6, 2001.

RO, J. Y.; LEE, J.-S.; ZHANG, Y. Activation of TRPV1 and TRPA1 leads to muscle nociception and mechanical hyperalgesia. **Pain**, 144, n. 3, 2009.

RODRIGUES, F. E. A.; LIMA, J. Q.; OLIVEIRA, M. D. C. F. D.; VASCONCELOS, J. N. Diterpene and other constituents from *Stemodia maritima* (Scrophulariaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 21, n. 8, 2010.

SANTOS, S. A. A. R.; DAMASCENO, M. D. B. M. V.; MAGALHÃES, F. E. A.; SESSLE, B. J.. Transient receptor potential channel involvement in antinociceptive effect of citral in orofacial acute and chronic pain models. **EXCLI Journal**, 21, 2022.

SILVA, F. R. L. D.; RODRIGUES, F. E. A.; GOMES, A. R. S.; ARRIAGA, A. M. C. Phytochemical study, antioxidant and antibacterial activities of *Stemodia maritima*. **Química Nova**, 37, 2014.

SIQUEIRA-LIMA, P. S.; ARAÚJO, A. A. S.; LUCCHESI, A. M.; QUINTANS, J. S. S.. β -cyclodextrin complex containing *Lippia grata* leaf essential oil reduces orofacial nociception in mice - evidence of possible involvement of descending inhibitory pain modulation pathway. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, 114, n. 2, 2014.

SNEDDON, L. Comparative Physiology of Nociception and Pain. **Physiology**, 33, n. 1, 2018.

SOARES, I. C. R.; SANTOS, S. A. A.; COELHO, R. F.; ALVES, Y. A. Oleanolic acid promotes orofacial antinociception in adult zebrafish (*Danio rerio*) through TRPV1 receptors. **Chemico-biological interactions**, 299, 2019.

SOUSA, R. S. D. **Investigação dos efeitos neurofarmacológicos de *Stemodia maritima* (Linn): alterações comportamentais e avaliação do estresse oxidativo.** 2017. 81 f. Dissertação -, Universidade Federal do Ceará.

STOCKBRIDGE, E. L.; SUZUKI, S.; PAGÁN, J. A. Chronic Pain and Health Care Spending: An Analysis of Longitudinal Data from the Medical Expenditure Panel Survey. **Health Services Research**, 50, n. 3, 2014.

SUZUKI, M. Role of N-methyl-D-aspartate receptor antagonists in postoperative pain management. **Current opinion in anaesthesiology**, 22, n. 5, 2009.

TAYLOR, J. C.; PRETA, L. S. A.; TOTSCH, S. K.; YESSICK, L. R. *et al.* A novel zebrafish-based model of nociception. **Physiology & behavior**, 174, 2017.

TEIXEIRA, A. H.; FREIRE, J. M. D. O.; DE SOUSA, L. H. T.; PARENTE, A. T. *et al.* Frontiers | *Stemodia maritima* L. Extract Decreases Inflammation, Oxidative Stress, and Alveolar Bone Loss in an Experimental Periodontitis Rat Model. **Frontiers in Physiology**, 8, 2017.

TRIZE, D. D. M.; CALABRIA, M. P.; FRANZOLIN, S. D. O. B.; CUNHA, C. O. *et al.* Is quality of life affected by temporomandibular disorders? **einstein (São Paulo)**, 16, n. 4, 2018.

TROUVIN, A.-P.; PERROT, S. New concepts of pain - PubMed. **Best practice & research. Clinical rheumatology**, 33, n. 3, 2019.

URTADO, M. B. **Envolvimento dos receptores TRPV1, centrais e periféricos, na hiperalgesia da ATM induzida pela retirada do etanol.** 2008. 69 f. (Mestrado) -, Universidade Estadual de Campinas.

VALLIN, S.; VIDA, P.; HÄGGMAN-HENRIKSON, B.; VISSCHER, C. *et al.* Temporomandibular disorder pain is associated with increased sick leave and reduced health related quality of life - PubMed. **European journal of pain (London, England)**, 28, n. 10, 2024.

VAZ, R.; HOFMEISTER, W.; LINDSTRAND, A. Zebrafish Models of Neurodevelopmental Disorders: Limitations and Benefits of Current Tools and Techniques. **International Journal of Molecular Sciences**, 20, n. 6, 2019.

WANG, S.; BIAN, L.; YIN, Y.; GUO, J. Targeting NMDA Receptors in Emotional Disorders: Their Role in Neuroprotection. **Brain Science**, 12, n. 10, 2022.

WANG, S.; BRIGOLI, B.; LIM, J.; KARLEY, A. Roles of TRPV1 and TRPA1 in Spontaneous Pain from Inflamed Masseter Muscle. **Neuroscience**, 384, 2018.

WANG, S.; LIM, J.; JOSEPH, J.; WANG, S.. Spontaneous and Bite-Evoked Muscle Pain Are Mediated by a Common Nociceptive Pathway With Differential Contribution by TRPV1. **The journal of pain**, 18, n. 11, 2017.

YANG, F.; SIVILS, A.; CEGIELSKI, V.; SINGH, S.. Transient Receptor Potential (TRP) Channels in Pain, Neuropsychiatric Disorders, and Epilepsy. **International Journal of Molecular Sciences**, 24, n. 5, 2023.

YOUSOFVAND, N.; MOLOODI, B. An overview of the effect of medicinal herbs on pain. **Phytotherapy Research**, 2022.

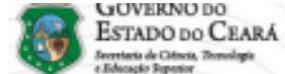
ZUO, X.; LING, J. X.; XU, G.-Y.; GU, J. G. Operant behavioral responses to orofacial cold stimuli in rats with chronic constrictive trigeminal nerve injury: effects of menthol and capsazepine. **Molecular Pain**, 9, 2013.

ANEXO A- CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DO CEARÁ

Av. Dr. Silas Munguba, 1700 – Itaperi
CEP 60740-903 – fone 3101-9890
ceua.uece@uece.br – www.uece.br/ceua



GOVERNO DO
ESTADO DO CEARÁ
Secretaria de Ciência, Tecnologia
e Educação Superior

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “**Bioprospecção de Atividades Antinociceptiva, Anti-inflamatória, Ansiolítica, Anticonvulsivante e Anti-hiperglicemiante de Produtos Naturais e Sintéticos de Plantas Medicinais e Comercializados no Nordeste brasileiro em Zebrafish (*Danio rerio*) adulto**” registrado sob o número **05299177/2021**, tendo como pesquisador principal **Francisco Ernani Alves Magalhães**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotados pela **Comissão de Ética para o Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (CEUA – UECE)**. Este certificado expira-se em 31 de June de 2026.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Project entitled “**Bioprospecting of Antinociceptive, Anti-inflammatory, Anxiolytic, Anticonvulsant and Antihyperglycemic Activities of Natural and Synthetic Products from Medicinal Plants and Marketed in Northeastern Brazil in Zebrafish (*Danio rerio* adult)**” registered with the protocol **05299177/2021**, under the supervision of **Francisco Ernani Alves Magalhães**, is in agreement with Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation of Ceará State University (CEUA – UECE)**. This certificate will expire on June 31st, 2026.

RESUMO

Vigência do projeto	Início	Setembro de 2021	Fim	31 de Junho de 2026	
Espécie/Linhagem	Zebrafish (<i>Danio rerio</i>) adulto				
Número de animais	5.000	Peso	0,3-0,5g	Idade	60-90d
Sexo	2.500	Feminino	2.500	Masculino	
Origem	Fornecedor comercial em Fortaleza-Ce)				
Metodologia	X	Adequada		Não adequada	
Cronograma	X	Adequado		Não adequado	
Ofício de encaminhamento	X	Presente		Ausente	
Orçamento	X	Adequado		Não adequado	
Financiamento	Órgão de fomento	Recursos de Pesquisa e Parcerias			
	N. processo	-			

Fortaleza, 24 de agosto de 2021.

Vania Marilande Ceccatto