



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

**JOANNA TRYCIA MAGALHÃES ALEXANDRE LIMA**

**CARACTERIZAÇÃO NEUROQUÍMICA DAS VIAS DA DOR EM ENSAIO PRÉ-  
CLÍNICO DE PERIODONTITE**

**SOBRAL**

**2019**

JOANNA TRYCIA MAGALHÃES ALEXANDRE LIMA

CARACTERIZAÇÃO NEUROQUÍMICA DAS VIAS DA DOR EM ENSAIO PRÉ-  
CLÍNICO DE PERIODONTITE

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

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Helliada Vasconcelos Chaves.

Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Mirna Marques Bezerra Brayner.

SOBRAL

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

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

---

L698c Lima, Joanna Trycia Magalhães Alexandre.  
Caracterização Neuroquímica das Vias da Dor em Ensaio Pré-Clínico de Periodontite / Joanna Trycia Magalhães Alexandre Lima. – 2019.  
85 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Campus de Sobral, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Sobral, 2019.

Orientação: Profa. Dra. Hellíada Vasconcelos Chaves.

Coorientação: Profa. Dra. Mirna Marques Bezerra Brayner.

1. Periodontite. 2. Nocicepção. 3. Inflamação. 4. Opioides. I. Título.

CDD 610

---

JOANNA TRYCIA MAGALHÃES ALEXANDRE LIMA

CARACTERIZAÇÃO NEUROQUÍMICA DAS VIAS DA DOR EM ENSAIO PRÉ-  
CLÍNICO DE PERIODONTITE

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

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

BANCA EXAMINADORA

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Hellíada Vasconcelos Chaves. (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Mirna Marques Bezerra (Co-Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Carolina da Silva Carvalho  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Iracema Matos de Melo  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Ao meu amado esposo Danilo, por toda a força,  
compreensão e apoio incondicional que foram  
essenciais nessa jornada.

## AGRADECIMENTOS

A Deus que me iluminou, me guiou e tornou possível a realização desse sonho mesmo diante às adversidades.

À minha orientadora Prof.<sup>a</sup> Dra. Helliada Vasconcelos Chaves, pelos ensinamentos valiosos, pela cobrança, por acreditar na minha capacidade e por sempre mostrar que apesar das circunstâncias podemos realizar grandes coisas.

À Prof.<sup>a</sup> Mirna Marques Bezerra, por todo conhecimento repassado, por sempre estar disponível, por ser nossa porta-voz em Fortaleza e por ter essa voz mansa que revigora os ânimos.

Aos membros da banca Prof.<sup>a</sup> Dra. Iracema Matos de Melo e Prof.<sup>a</sup> Dra. Carolina da Silva Carvalho por terem aceito o convite e por suas considerações, as quais contribuíram para o enriquecimento desde trabalho.

Ao meu amigo e aluno de iniciação científica (IC) Sebastião, que sempre esteve disponível para me ajudar, inclusive sábado, domingo e feriados e sempre esteve de prontidão para me aconselhar e tentar descobrir soluções para o desenvolvimento desse trabalho.

A todos os ICS do LAFS, Ariely, Andressa, Tiago, Manoel, Pedro Wherton, Pedro Ivo, Renato, Fernanda, Sara, Pedro Fontenele que se dedicaram, madrugaram aos sábados, domingos e feriados para me acompanhar na execução desse trabalho.

À Nayara, que foi uma amiga, me ajudou inúmeras vezes, foi comigo à Fortaleza em busca de novos conhecimentos e técnicas, me acompanhou nas dosagens e contribuiu imensamente com seus conhecimentos ao longo dessa jornada.

À Luzia Hermínia que estava sempre disposta a fazer as induções da periodontite e a me aconselhar.

À Isabela por toda a parceria, a proatividade e contribuição científica nos ensaios de comportamento e perda óssea.

À Prof.<sup>a</sup> Dra. Virgínia Claudia Carneiro pela contribuição com seus ensinamentos e disponibilidade em nos ajudar com o ensaio imuno-histoquímico.

Aos técnicos Júnior e Flávia pela ajuda e disponibilidade em contribuir com este trabalho. O Júnior nunca disse um não às nossas demandas; e a Flavinha que sempre nos intermediava com o transporte de reagentes entre NEMPI-LAFS.

À Josyane (Conceição da Silva Martins), Guilherme, Letícia e ao laboratório NEMPI pela parceria e ajuda na execução do Western Blotting, e pela ótima acolhida e compartilhamento de conhecimentos.

Ao Prof. Dr. José Jackson do Nascimento Costa que pacientemente me ajudou na execução do ensaio de PCR e contribuiu imensamente com seus conhecimentos.

Ao casal oficial LAFS, Ellen e Felipe que me acolheram no laboratório.

Às minhas amigas da pós: Ester, Larissa, Tamara, Germana, Jordânia, Isabela e Luzia que além de contribuir com seus conhecimentos ainda tornaram meus dias mais alegres.

À Alana (veterinária da UFC e membro do comitê de ética) pela sua simpatia e por suas dicas valiosas na elaboração do projeto.

À toda equipe do Laboratório de Farmacologia de Sobral pelos momentos de colaboração e descontração.

A todos os funcionários e professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Aos colegas da turma de mestrado, pelos momentos de reflexão e sugestões recebidas.

Aos funcionários do biotério, sempre solícitos.

Aos animais que deram sua vida para que essa pesquisa pudesse ser realizada.

À CAPES, ao CNPQ e à FUNCAP pelo suporte financeiro.

À UFC instituição que eu amo e que há muito é minha casa, por todo conhecimento e experiência que proporcionou ao longo desses anos.

Aos meus amados pais Maria Tereza e Expedito Júnior, pela vida, pelo incentivo mesmo sabendo das dificuldades da ausência.

À minha avó Geralda de Paiva (*in memoriam*) que sempre foi um exemplo de garra para minha família.

Aos meus irmãos Bruno e Victor pelas palavras de incentivo e apoio.

Aos amigos e colegas do PSF Alisson Mendes, em especial, Gislane, Viviane, Cleyton e Dávila que tanto me apoiaram e me incentivaram nesse momento.

“Seja qual for o rumo que tomarmos, nosso destino  
está indissolavelmente ligado à ciência”

Carl Sagan

## RESUMO

A periodontite (PE) é uma doença imunoinflamatória crônica com perda dental, e, apesar da extensa destruição tecidual, não há sintomatologia dolorosa, levantando questões sobre quais alterações neuronais ocorrem. Esse trabalho vislumbra à caracterização neuroquímica das vias da dor em ensaio pré-clínico de periodontite. A PE foi induzida em ratos *Wistar* por ligadura de fio de náilon em torno dos 2º molares superiores esquerdos. Entre os dias 0 a 21 foi realizada análise de hipernocicepção mecânica por Von Frey. Para análise comportamental pelo teste da formalina, nos dias 1, 3, 5, 7, 11, 14 e 21, os ratos receberam uma injeção (sc) de formalina (0,5%) ou salina. Após avaliação nociceptiva, os animais foram perfundidos, eutanasiados e foram excisados: a maxila, a gengiva (GE), o gânglio trigeminal (GT) e o subnúcleo caudal (SC). Os parâmetros avaliados foram: análise da perda óssea alveolar (POA); quantificação dos níveis de mediadores pró-inflamatórios: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8 e PGE<sub>2</sub> na GE; quantificação dos níveis dos neurotransmissores: SP, CGRP e GLu na GE, GT e SC; imuno-histoquímica do receptor potencial transitório vaniloide do tipo 1 (TRPV1) no GT; análise da expressão gênica dos receptores opioides MOR ( $\mu$ ) e KOR ( $\kappa$ ) na GE e GT; e análise da expressão proteica dos receptores  $\mu$  e  $\kappa$  no GT. Na POA, os ratos submetidos à PE mostraram maior perda óssea nos dias 7, 11, 14 e 21, em relação ao normal. Houve aumento significativo de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8 e PGE<sub>2</sub> no 11º dia de PE em relação ao grupo normal. Na análise da hipernocicepção mecânica, ocorreu uma redução do limiar de retirada de cabeça no 11º dia de PE em relação ao dia 0 e ao 11º dia do grupo normal. No 17º dia de PE, houve aumento do limiar em comparação ao 11º dia de PE. Na hipernocicepção por formalina, apenas o grupo 11º dia de PE que recebeu formalina apresentou aumento significativo do comportamento nociceptivo em relação aos grupos normais (salina ou formalina) e ao grupo 11º dia de PE que recebeu salina. Nas dosagens de SP, GLu, CGRP e na análise da expressão de TRPV1 não houveram diferenças estatísticas entre os grupos. Na análise da expressão gênica dos receptores opioides na GE, observou-se um aumento significativo de MOR nos dias 7 e 11 de PE, e de KOR no 7º dia de PE em relação ao normal. No GT, a expressão gênica e os níveis de proteína de MOR aumentaram nos 11º e 14º dias, e do KOR aumentaram no 11º dia de PE em relação ao normal. Sugere-se que PE evoca uma sensibilização periférica no 11º dia mediada por TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8 e PGE<sub>2</sub>, porém não aumenta TRPV1, nem altera a liberação de SP, CGRP e GLu. Concomitantemente, ocorre inibição endógena da dor pelos receptores opioides  $\mu$  e  $\kappa$  nas fibras aferentes primárias e no GT.

**PALAVRAS-CHAVE:** Periodontite. Nocicepção. Inflamação. Opioides.

## ABSTRACT

Periodontitis (PE) is a chronic immunoinflammatory disease with dental loss, and despite extensive tissue destruction, there is no painful symptomatology, raising questions about which neuronal changes occur. This work focuses on the neurochemical characterization of pain pathways in a pre-clinical periodontitis test. PE was induced in Wistar rats by ligation of nylon wire around the left 2nd maxillary molars. Between days 0 to 21, a mechanical nociception analysis was performed (Von Frey). For behavioral analysis by the formalin test, on days 1, 3, 5, 7, 11, 14 and 21, rats received either formalin (0.5%) or saline (sc) injection. After nociceptive evaluation, the animals were perfused, euthanized and excised: the maxilla, gum (GU), trigeminal ganglion (TG) and caudal subnucleus (CS). The parameters evaluated were: alveolar bone loss analysis (ABL); quantification of the levels of proinflammatory mediators: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8 and PGE2 in GU; quantification of neurotransmitter levels: SP, CGRP and GLu in GU, TG and CS; immunohistochemistry of the potential transient vanilloid receptor 1 (TRPV1) in TG; analysis of the gene expression of MOR ( $\mu$ ) and KOR ( $\kappa$ ) opioid receptors in GU and TG; and analysis of the protein expression of  $\mu$  and  $\kappa$  receptors in TG. In ABL, rats submitted to PE showed greater bone loss on days 7, 11, 14 and 21, compared to normal. There was a significant increase of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8 and PGE2 on the 11th day of PE in relation to the normal group. In the analysis of mechanical nociception, there was a reduction of the head withdrawal threshold on the 11th day of PE in relation to day 0 and 11 of the normal group. On the 17th day of PE, there was an increase in the threshold compared to the 11th day of PE. In formalin nociception, only the eleventh day of PE that received formalin showed a significant increase in the nociceptive behavior in relation to the normal (saline or formalin) and to the 11th day of PE that received saline. In the dosages of SP, GLu, CGRP and in the analysis of TRPV1 expression there were no statistical differences between the groups. In the analysis of the gene expression of the opioid receptors in GU, a significant increase of MOR was observed on days 7 and 11 of PE, and of KOR on day 7 of PE in relation to normal. In TG, gene expression and protein levels of MOR increased on the 11th and 14th days, and KOR increased on the 11th day of PE in relation to normal. It is suggested that PE evokes peripheral sensitization on day 11 mediated by TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8 and PGE2, but does not increase TRPV1, nor does it alter the release of SP, CGRP and GLu. Concomitantly, endogenous pain inhibition by  $\mu$  and  $\kappa$  opioid receptors occurs in primary afferent fibers and TG.

**KEYWORDS:** Periodontitis. Nociception. Inflammation. Opioids.

## LISTA DE FIGURAS

Figura I - Mediadores envolvidos na sensibilização periférica após inflamação. ....	22
Figura II - Representação da área de atuação via nociceptiva trigeminal no tronco encefálico. .....	23
Figura III - Estrutura molecular do receptor TRPV1.....	28
Figura 1 - Fluxograma geral do estudo.....	42
Figura 2 - Análise macroscópica da Perda Óssea Alveolar em ratos .....	51
Figura 3 - Análise dos níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8 e PGE <sub>2</sub> no tecido gengival de ratos. ....	52
Figura 4 - Cinética da hipernocicepção mecânica em ratos submetidos à PE.....	53
Figura 5 - Comportamento nociceptivo na periodontite em ratos. ....	54
Figura 6 - Análise dos níveis de SP, CGRP e GLu em ratos submetidos à periodontite. ....	55
Figura 7 - Expressão de TRPV1 no GT.....	56
I) Fotomicrografia do gânglio trigeminal de ratos.....	56
II) Análise da expressão de TRPV1 no gânglio trigeminal de ratos submetidos à PE.....	56
Figura 8 - Níveis da expressão relativa de RNAm para MOR e KOR na GE e no GT de animais submetidos à PE. ....	57
Figura 9 - Níveis da expressão de MOR e KOR no GT de animais submetidos à PE. ....	58

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Pares de iniciadores utilizados em números de acesso de PCR e NCBI em tempo real. .....	49
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AChE	Acetilcolinesterase
ANOVA	Análise Estatística de Variância Amostral
ATM	Articulação Temporomandibular
CaM	Calmodulina
cDNA	DNA Complementar
CEUA	Comitê de Ética em Uso Animal
CGRP	Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina
CINC-1	Citocina quimioatrativa-1
CFA	Adjuvante completo de Freund
CXCR4	Receptor de quimiocina CXC tipo
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
ELISA	Teste Imunoenzimático
EPG	Extrato de <i>Porphyromonas gingivalis</i>
ERO	Espécies Reativas de oxigênio
EVA	Escala Visual Analógica da dor
GLu	Glutamato
GPCRs	Receptores em hélice de sete transmembranas acoplados à proteína G
HRP	Estreptavidina Conjugada
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio
IASP	Associação Internacional do para o Estudo da Dor
IL	Interleucina
KOR	Receptor opioide $\kappa$ (kappa)
MOR	Receptor opioide $\mu$ (mu)
NE	Noradrenalina
NDMA	Receptor ionotrópico ativado por glutamato
NF- $\kappa$ B	Fator Nuclear Kappa B
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
Oprk1	Receptor opioide <i>kappa 1</i>
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
PE	Periodontite

PFA	Paraformaldeído
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina do tipo E2
pH	Potencial Hidrogeniônico
PIB	Produto Interno Bruto
PKC	Proteína quinase C
PKC $\beta$ II	Proteína quinase C subtipo $\beta$ II
POA	Perda Óssea Alveolar
qRT-PCR	PCR em tempo real
RNA <sub>m</sub>	RNA mensageiro
SBED	Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor
SNC	Sistema Nervoso Central
SP	Substância P
SUS	Sistema Único de Saúde
SW	Monofilamentos de Semmes-Weinstein
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral $\alpha$
TRPV1	Receptor potencial transitório do subtipo de 1
$\mu$	Receptor opioide mu
$\kappa$	Receptor opioide kappa
$\delta$	Receptor opioide delta

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>17</b>
2.1	Periodontite .....	17
2.2	Dor orofacial .....	18
2.3	Interação entre a periodontite e a dor .....	24
2.4	TRPV1 .....	26
2.5	Mecanismo de ação dos opioides na modulação da dor .....	29
2.6	Modelos experimentais de avaliação da dor .....	31
2.6.1	<i>Hipernocicepção induzida por formalina .....</i>	<i>31</i>
2.6.2	<i>Hipernocicepção mecânica por Von Frey elétrico.....</i>	<i>33</i>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>35</b>
3.1	Objetivo Geral .....	35
3.2	Objetivos Específicos.....	35
<b>4</b>	<b>CAPÍTULO 1: “Caracterização Neuroquímica das Vias da Dor em Ensaio Pré-clínico de Periodontite” .....</b>	<b>36</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>73</b>
	<b>ANEXO A – APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA NO COMITÊ DE ÉTICA PARA USO EM ANIMAIS.....</b>	<b>84</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença imunoinflamatória crônica de alta prevalência na população mundial, caracterizada por alterações histopatológicas irreversíveis que incluem a destruição do ligamento periodontal, do cemento radicular e do osso alveolar, que, quando não tratada, poderá culminar em perdas dentárias. A complexa patogênese da doença periodontal deve-se à estreita inter-relação entre o agente infeccioso (biofilme associado aos dentes) e a resposta imune inflamatória exacerbada do hospedeiro que promove destruição tecidual (PIHLSTROM; MICHALOWICZ; JOHNSON, 2005; GIANNOBILE, 2008; DUTZAN et al., 2015; SILVA et al., 2015).

A dor e a destruição tecidual normalmente se correlacionam em doenças crônicas. No entanto, em pacientes com periodontite, apesar de ser uma doença crônica com extensa destruição tecidual, não há sintomatologia dolorosa. A relação entre a dor, ou a ausência dela, na periodontite não é completamente compreendida. Alguns autores sugeriram que a periodontite não parece estar associada à percepção de dor (DUMITRESCU et al., 2004). Outros autores foram mais taxativos e asseguram haver completa ausência de dor durante a doença periodontal (GAURILCIKAITE; RENTON; GRANT, 2017; SUZUKI et al., 2017). Outra linha de pesquisa, entretanto, defende que há possibilidade de ocorrer sensibilização dolorosa durante a periodontite, haja vista que o periodonto contém abundantes terminações nervosas sensoriais (nociceptores) (MENGEL et al., 1988; MIRANDA-RIUS; BRUNET-LLOBET; LAHOR-SOLER, 2018). Além disso, as alterações de pH, temperatura, mediadores inflamatórios e endotoxinas presentes na periodontite podem ser suficientes para estimular os nociceptores nos tecidos periodontais (LUTHMAN et al., 1989).

Durante um processo infeccioso, a sensibilização dos nociceptores pode ser originada tanto através de componentes bacterianos bioativos e fatores de virulência, quanto de mediadores inflamatórios oriundos de células residentes, como macrófagos, ou outras células que migram para o local da lesão, como neutrófilos e monócitos, como também de neurotransmissores que podem ser liberados antidromicamente pelas terminações nervosas aferentes, tudo isso como resposta inflamatória à presença de tais micro-organismos (GYÖRFI; FAZEKAS; ROSIVALL, 1992; GAURILCIKAITE; RENTON; GRANT, 2017). Nesse processo, ocorre o desenvolvimento de uma atividade contínua nas fibras nervosas aferentes, tornando-as mais sensíveis à estimulação, e até mesmo aos estímulos que normalmente são inócuos, o que caracteriza a sensibilização periférica (CHICHORRO; PORRECA; SESSLE, 2017).

Para ocorrer a sensibilização de neurônios sensitivos, vários receptores e canais iônicos são ativados (HUNG; TAN, 2018). O receptor de potencial transitório vaniloide tipo 1 (TRPV1), membro da família de canais transientes, possui papel relevante para a geração de potenciais de ação durante a inflamação. Quando na presença de mediadores inflamatórios, como os prostanoídes (como a prostaglandina E2), neuropeptídeos (como a substância P), aminoácidos excitatórios (como o glutamato), bradicinina, leucotrienos e citocinas (como TNF- $\alpha$  e IL-6), muitos dos quais estão presentes na periodontite, ocorre uma diminuição dos limiares de ativação dos nociceptores gerando comportamentos patológicos da dor, como hiperalgesia térmica, dor espontânea e alodinia mecânica (CATERINA et al., 2000; BHAVE; GEREAU, 2004; MA; QUIRION, 2007; LIS et al., 2017).

Também, foi observada que a magnitude da resposta inflamatória produzida sistemicamente pela doença periodontal pode promover uma inflamação do tipo neurogênica (DE AVILA et al., 2014). Sabe-se que os tecidos periodontais possuem fibras nervosas imunorreativas a inúmeros neuropeptídeos, que incluem a Substância P (SP), o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), o glutamato (GLu), e neuropeptídeo Y (DE AVILA et al., 2014; LUNDY et al., 2000; LUNDY; LINDEN, 2009; LUTHMAN et al., 1989). Esses neurotransmissores são liberados centralmente no processo de transmissão do impulso nociceptivo, mas podem ser liberados antidromicamente nos tecidos periféricos aumentando resposta inflamatória e causando sensibilização periférica (KEEN et al., 1982; FLORES et al., 2001; SESSLE, 2005).

Ademais, sabe-se que a percepção da dor é dependente de vários mecanismos modulatórios que transformam a entrada nociceptiva aferente na sensação de dor no sistema nervoso central. Tais mecanismos endógenos de modulação da dor podem ser inibitórios ou facilitadores e determinam a intensidade da sensação dolorosa após um evento nocivo (OSSIPOV et al., 2010). Sabe-se que um dos importantes sistemas modulatórios da dor é via opioide. Os opioides endógenos são relevantes para experiência da dor humana em muitos cenários, por serem amplamente utilizados nos tratamentos de dores graves e crônicas (OSSIPOV et al., 2010; AL-HASANI; BRUCHAS, 2011; CLARKE et al., 2015; DE FELICE; OSSIPOV, 2016a). Os opioides endógenos como endorfinas, dinorfinas e encefalinas se ligam aos receptores  $\mu$  (mu),  $\kappa$  (kappa) e  $\delta$  (delta), presentes em células neurais, inibem a transmissão pré-sináptica de mediadores como: noradrenalina (NE), acetilcolina, glutamato e substância P, no corno dorsal da medula espinhal e subnúcleo caudal do trato espinal do nervo trigêmeo (CANO et al., 1999; SESSLE, 2005; BINGEL; TRACEY, 2008; LITTLEJOHN; GUYMER; NGIAN, 2016).

Neste sentido, torna-se intrigante a relação entre a resposta dolorosa em pacientes com periodontite. Este trabalho, então, propõe a caracterização neuroquímica das vias da dor em ensaio pré-clínico de periodontite

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Periodontite

A periodontite é uma condição imunoinflamatória que afeta os tecidos de suporte do dente (ligamento periodontal, cemento radicular e osso alveolar) podendo levar à perda dentária (BUHLIN et al., 2003; PIHLSTROM; MICHALOWICZ; JOHNSON, 2005; WINNING; LINDEN, 2017). Os sinais clínicos mais comuns da periodontite são o sangramento e o edema gengival. As formas mais avançadas manifestam-se por recessão gengival, aumento do fluido crevicular, aumento da mobilidade, supuração e eventual progressão até à perda dentária (BĂLAN, 2010; GOULART et al., 2017).

A análise epidemiológica da população mundial revelou que a periodontite é considerada de alta prevalência e a segunda principal causa de perda dentária (PETERSEN; BAEHNI, 2012; KAYAL, 2013). Conforme a antiga classificação das doenças periodontais, a forma grave afeta 10% a 20% da população mundial. A prevalência das formas leve e moderada varia de 20% a 50% na população, podendo chegar a 85% na população mais idosa (AIMETTI et al., 2015; MUHAMMAD ASHRAF NAZIR, 2017). No Brasil a prevalência da periodontite é de 79% (ARAÚJO; SUKEKAVA, 2007). A periodontite, portanto, constitui-se como um importante problema de saúde pública, além de ser cada vez mais reconhecido o seu envolvimento com a progressão de patologias sistêmicas, como diabetes mellitus, doenças cardiovasculares e respiratórias (BĂLAN, 2010; HAJISHENGALLIS; LAMONT; GRAVES, 2015).

A patogênese da doença periodontal é multifatorial, que envolve um desafio microbiano, os fatores ambientais e a resposta imune/inflamatória exacerbada, que resulta na destruição dos tecidos (GIANNOBILE, 2008; TOMINARI et al., 2012; SLOTS, 2013; HUANG et al., 2016). Além disso, a resposta imune inflamatória desencadeada pela microbiota patogênica resulta na liberação de um conjunto de mediadores pró-inflamatórios, como citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8), prostaglandinas, óxido nítrico e produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), que são responsáveis pela amplificação e manutenção da resposta inflamatória, levando, em última instância, à destruição do osso alveolar (KAYAL, 2013; ARAÚJO et al., 2013; ANBINDER et al., 2016; HATIPOGLU; YAYLAK; GUNGOR, 2015).

Modelos animais da periodontite induzida por ligadura são bem estabelecidos na literatura. Os modelos em ratos são comumente usados em estudos da periodontite e, embora tenham algumas restrições, a estrutura e a organização dos tecidos periodontais são semelhantes às dos seres humanos. Além disso, os modelos de ratos têm menos limitações do que os modelos

*in vitro*, que não podem reproduzir a complexidade da interação envolvendo bactérias (biofilme oral), fatores ambientais e a resposta imuno/inflamatória do hospedeiro (BEZERRA et al., 2000; LEITÃO et al., 2004; OZ; STRUILLOU et al., 2010; PULEO, 2011; HAJISHENGALLIS; LAMONT; GRAVES, 2015). O modelo experimental utilizado por nosso grupo de pesquisa, que é extensamente publicado, se caracteriza pela ligadura de um fio de náilon em torno do 2º molar superior esquerdo, que serve como depósito de biofilme dental, o que leva à periodontite, resultando em perda óssea (BEZERRA et al., 2000; DE LIMA et al., 2000; GOES et al., 2010; SOUSA et al., 2016; ALEXANDRE et al., 2018).

A periodontite trata-se de uma doença de curso incomum, haja vista que a maioria das doenças inflamatórias prossegue com estados dolorosos crônicos. A dor na periodontite, no entanto, não é um sintoma clínico, podendo resultar em atrasos na detecção pelos pacientes e tratamento da doença (GAURILCIKAITE; RENTON; GRANT, 2017). Entretanto, a compreensão da relação entre a periodontite e a dor ainda não está bem esclarecida. Alguns autores desacreditam que possa haver essa relação (ABD EL-ALEEM; MORALES-AZA; DONALDSON, 2004; SUZUKI et al., 2017), enquanto, outros defendem que a presença de mediadores da inflamação e neurotransmissores podem desencadear um processo doloroso na periodontite (GRIESBACHER; SUTLIFF; LEMBECK, 1994; DS; AJ; KF, 2008; DURHAM et al., 2013; MIRANDA-RIUS; BRUNET-LLOBET; LAHOR-SOLER, 2018).

## **2.2 Dor orofacial**

A IASP (Associação Internacional para o Estudo da Dor), em 1979, aprovou uma definição de dor que não apenas reconhecia a associação entre lesão tecidual e dor, como também acoplava as dimensões sensoriais e emocionais da experiência dolorosa, definindo-a como “Uma experiência sensorial e emocional desagradável associada com dano tecidual real ou potencial, ou descrito em termos de tal dano” (IASP, 1979). Recentemente essa definição passou por uma atualização, em que a IASP definiu a dor como “Uma experiência somática mutuamente reconhecível que reflete a apreensão de uma pessoa à ameaça à sua integridade física ou existencial” (COHEN; QUINTNER; VAN RYSEWYK, 2018). A dor, portanto, engloba componentes emocionais, comportamentais e cognitivos de uma resposta nociceptiva (DE FELICE; OSSIPOV, 2016).

A dor é um grave problema de saúde pública. Sua prevalência é crescente e representa o principal motivo de procura por assistência à saúde (SCHAPPERT; BURT, 2006). Além disso, a dor é considerada a condição que apresenta maior impacto negativo na qualidade

de vida na população mundial. O custo anual com a dor é maior do que o custo com a doença cardíaca ou câncer, chegando a ter um impacto orçamentário em cerca de 3,0% do Produto Interno Bruto (PIB) dos países ao redor do mundo (HENSCHKE; KAMPER; MAHER, 2015).

Estima-se ainda que, dentre a população total que padece com algum tipo de dor, a dor do tipo crônica possui prevalência média na população geral de 35,5% (IASP, 2003). Além da carga física e emocional, a dor crônica também produz um alto custo financeiro para a sociedade. Calculam-se gastos em mais de 200 bilhões de euros por ano na Europa e 150 bilhões de dólares por ano nos EUA (TRACEY; BUSHNELL, 2009).

Dentre as possíveis dores que podem acometer o corpo humano, a dor orofacial apresenta-se de forma muito importante e tem uma expressão particular. A Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor (SBED) estima que mais de 10 milhões de pessoas no Brasil são acometidas por esta condição (SBED, 2005).

Sessle (2005) relatou que a face e a boca têm especial papel biológico, emocional e psicológico diferente para cada indivíduo. Juntas, essas regiões representam os sítios de maior representatividade dolorosa no córtex somatossensorial. Além disso, esse autor analisou na literatura informações sobre os processos periféricos pelos quais estímulos nocivos ativam ou modulam aferentes nociceptivos no tronco cerebral, e concluiu que a transmissão somatossensorial pode ser modulada em níveis neuronais talâmicos e corticais. Porém, a maior parte da modificação das mensagens ascendentes somatossensorial ocorre mais cedo na via trigeminal somatossensorial (tronco cerebral). O conhecimento sobre a neurofisiologia da dor orofacial é importante para compreender os fatores de risco associados à presença e ao desenvolvimento das dores crônicas orofaciais (VAN HECKE; TORRANCE; SMITH, 2013).

As dores orofaciais são transmitidas através de impulsos nociceptivos levados da periferia ao SNC, principalmente por meio do V par de nervos cranianos, o nervo trigêmeo, mas também carregado por outras estruturas nervosas como nervo facial (VII), nervo glossofaríngeo (IX), nervo vago (X) e nervos cervicais superiores (SESSLE, 2000). O nervo trigêmeo (V) é dividido em três ramos e contém a maioria das fibras nervosas sensoriais que inervam os tecidos orofaciais. O ramo oftálmico, ou primeira divisão do V nervo, é responsável pela inervação dos tecidos supra-orbitais, das meninges e da córnea. O ramo maxilar, ou segunda divisão, inerva a pele infra-orbitária, o lábio superior, a mucosa maxilar, a maxila, seios paranasais, meninges e os dentes superiores. O ramo mandibular, ou terceira divisão, fornece suprimento nervoso para a pele da mandíbula, osso mandibular, lábio inferior, mucosa bucal, glândulas, meninges e dentes inferiores (BRANCH, 1990; DUBNER; SESSLE; STOREY, 1978).

Nos tecidos periféricos, os estímulos de natureza química, térmica ou mecânica levam à transdução de impulsos elétricos no eixo terminal dos nociceptores. Essas estruturas nervosas possuem limiar de ativação relativamente alto, pois funcionam como sensores para fortes estímulos mecânicos, irritantes químicos e estímulos térmicos nocivos, ou seja, apenas estímulos potencialmente capazes de atingir o limiar nociceptivo podem gerar potenciais de ações que são transmitidos e percebidos como sinais de dolorosos (DUBIN; PATAPOUTIAN, 2010). Um estímulo nocivo, portanto, pode gerar uma sensibilização periférica aumentando a excitabilidade das terminações nervosas aferentes ou nociceptores. Os processos envolvidos na sensibilização periférica são associados à diminuição do limiar de atividade e aumento da responsividade do nociceptor, o que pode contribuir para a sensibilidade aguda da dor que ocorre no local do estímulo (hiperalgesia primária). Além disso, as substâncias químicas pró-inflamatórias podem agir nas terminações aferentes aumentando a área de abrangência dolorosa. Acredita-se que esse aumento de responsividade e redução do limiar contribuam para espontaneidade da dor, alodinia e hiperalgesia secundária contribuindo para cronicidade da dor (CHEN; TANNER; LEVINE, 1999; GUENTHER; REEH; KRESS, 1999; SESSLE, 2005; SESSLE, 2008).

De fato, as aferências primárias são distinguidas em somática, que envolve pele, músculos e articulações, e em visceral, que abrangem as vísceras e os vasos sanguíneos. A aferência somática pode ser distinguida em exterocepção, de estruturas da pele, e propriocepção, advinda de receptores em músculos, tendões e articulações. A exterocepção pode ainda ser compreendida como epicrítica, envolvendo tato e pressão, e protopática, envolvendo dor e temperatura. Os mecanorreceptores de baixo limiar estão associados principalmente a fibras aferentes primárias do tipo A $\beta$ , que são fibras de grande calibre, bastante mielinizadas e alta velocidade de condução, caracterizando a exterocepção epicrítica. Nas outras fibras aferentes primárias, os nociceptores estão associados às fibras (A $\delta$ ), que são mielinizadas e de pequeno calibre diâmetro com condução rápida da nocicepção, e as fibras C, não mielínicas e de condução mais lenta, ambos caracterizando a exterocepção protopática. Vale ressaltar, que algumas fibras aferentes A $\beta$  podem assumir função nociceptiva quando há sensibilização periférica (DUBNER; BENNETT, 1983; SESSLE, 2005; 2011; CHICHORRO; PORRECA; SESSLE, 2017)

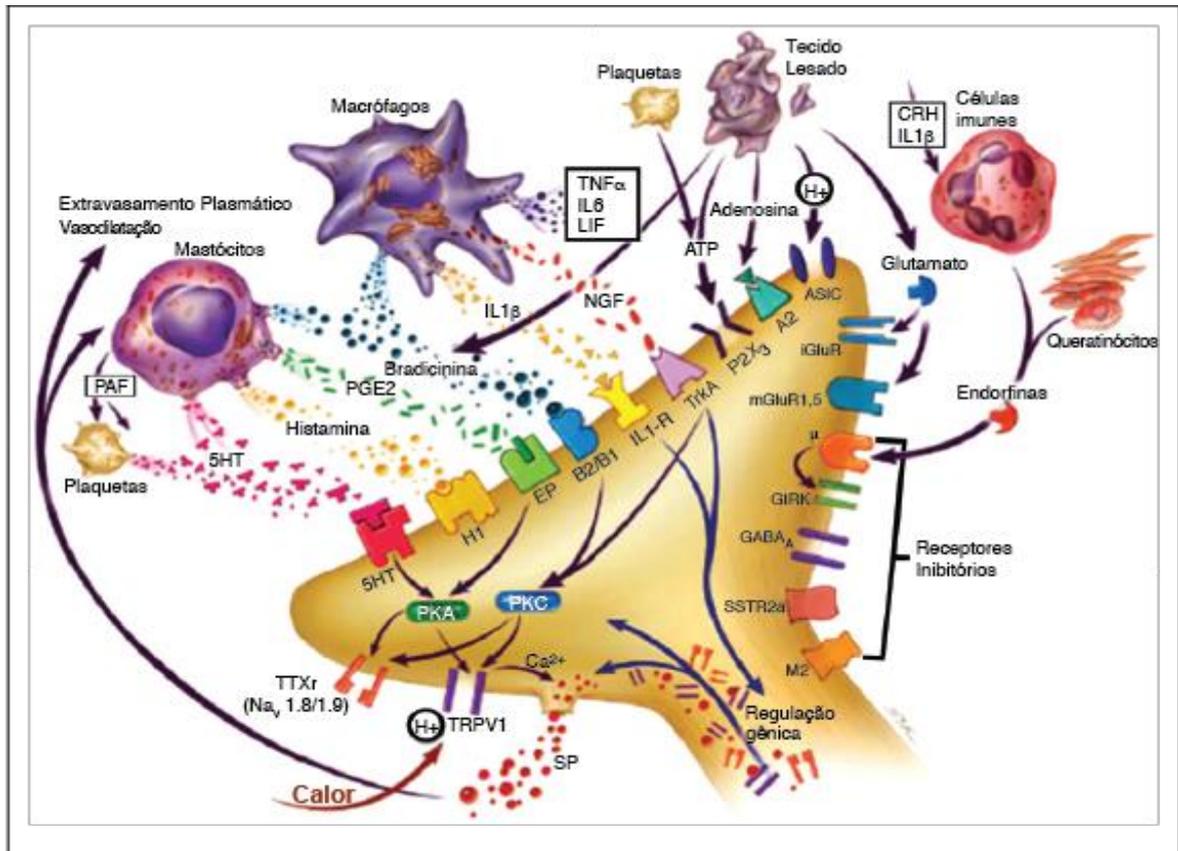
Na dor nociceptiva inflamatória, há envolvimento de estímulo de células residentes e migração de células inflamatórias, com extravasamento de plasma, e ativação de terminais aferentes primários. Sumariamente, tal estímulo nocivo provoca a liberação de uma diversidade de mediadores químicos, incluindo aminoácidos, aminas, lipídios, prostanoídes, citocinas,

bradicinina e neuropeptídios como glutamato (GLu), peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e Substância P (SP) (CAIRNS; REN; TAMBELI, 2014; KIM; MOALEM-TAYLOR, 2011; SESSLE, 2005; SESSLE, 2011). A SP é um neurotransmissor liberado das terminações nervosas em muitos tecidos e possui um papel importante na inflamação, através da degranulação de mastócitos e estimulação da reabsorção óssea (AZUMA et al., 2005). O CGRP é um potente vasodilatador e é liberado em paralelo com a SP, que pode apresentar atividade anti-inflamatória (LUNDY; LINDEN, 2009). O glutamato é um aminoácido excitatório que participa do processo de reabsorção óssea através do recrutamento de macrófagos e formação de osteoclastos (CHICHORRO; PORRECA; SESSLE, 2017; YANG et al., 2017).

As citocinas tem papel crucial na estimulação hiperalgésica. Estudos demonstram que estímulos inflamatórios não induzem diretamente a liberação de mediadores químicos atuantes na hiperalgesia. Em vez disso, uma cascata coordenada de citocinas precede sua liberação (CUNHA; FERREIRA, 2003; VERRI et al., 2006). Inicialmente, ocorre uma formação de bradicinina, que induz a liberação subsequente da cascata de citocinas pró-inflamatórias. A primeira citocina liberada é o TNF- $\alpha$ , que desencadeia a liberação de IL-6 e IL-1 $\beta$  através de neutrófilos estimulados pela citocina quimioatrativa-1 (CINC-1) (homóloga da IL-8 em humanos). Essa cascata é responsável pela estimulação dos principais mediadores primários da hipernocicepção, a síntese de prostaglandinas e liberação de aminas simpáticas (CUNHA et al., 1991; CUNHA et al., 1992; CUNHA et al., 2005; CUNHA et al., 2008).

É importante destacar que o terminal sensorial dos neurônios aferentes expressa diferentes receptores (Figura I) (CHICHORRO; PORRECA; SESSLE, 2017; WOLLER et al., 2017). Vale ressaltar ainda, que os aferentes nociceptivos podem sofrer alterações fenotípicas sob condições inflamatórias e desenvolver aumento da expressão de alguns receptores e canais iônicos. A ativação dos receptores terminais causa a despolarização e o aumento do cálcio intracelular, ativando várias proteínas quinases. As quinases, por sua vez, fosforilam o transdutor de proteínas (por exemplo, receptor de potencial transitório vaniloide 1 (TRPV1) e canais de íons, levando-os ao reforço da ativação (HOEIJMAKERS et al., 2012).

Figura I - Mediadores envolvidos na sensibilização periférica após inflamação.



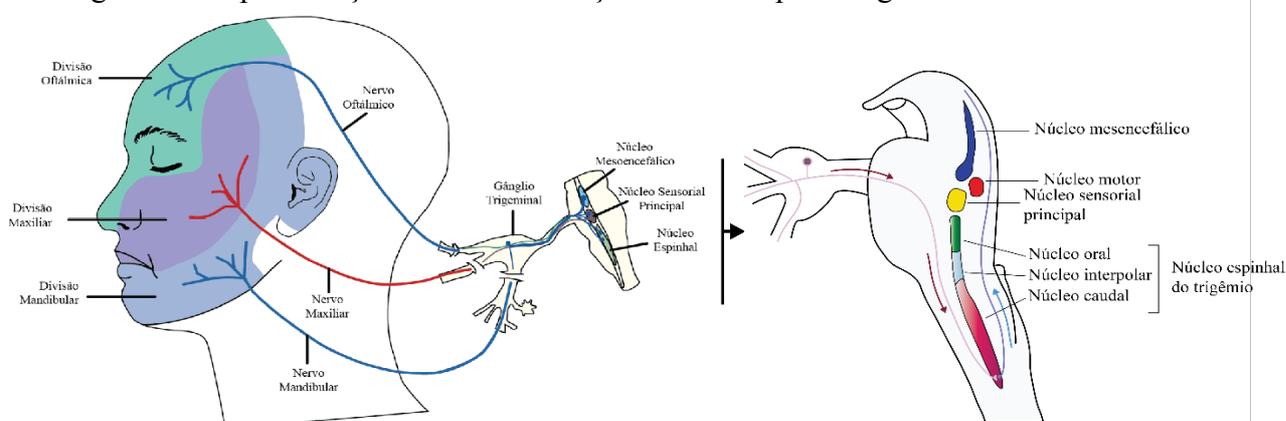
Como parte do processo inflamatório, numerosos produtos químicos são liberados a partir de mastócitos, células imunes, macrófagos e células lesadas que atuam nos canais iônicos ou nos receptores de membrana em terminações nervosas aferentes periféricas e, portanto, podem alterar a sensibilidade desses nociceptores. Alguns desses mediadores produzem um aumento na excitabilidade do aferente nociceptivo, e outros podem exercer efeitos inibitórios. ASIC, canal iônico sensível ao ácido; CRH, liberação de corticotrofina hormônio; GIRK, canal de potássio retificador interno acoplado à proteína G; 5-HT, serotonina; iGluR, glutamato receptor ionotrópico; IL-1 $\beta$ , interleucina-1 beta; IL-6, interleucina-6; LIF, fator inibidor de leucemia; receptor de opioide m, m; M2, receptor muscarínico; mGluR, receptor de glutamato metabotrópico; NGF, fator de crescimento nervoso; PAF, fator ativador de plaquetas; PGE<sub>2</sub>, prostaglandina E2; PKA, proteína quinase A; PKC, proteína cinase C; SSTR2A, receptor de somatostatina 2A; TNF- $\alpha$ , fator de necrose tumoral alfa; TrkA, tirosina receptor quinase A; TRPV1, potencial receptor transiente do vaniloide 1; Canal de sódio resistente à tetrodotoxina.

Fonte: Traduzida pela autora do trabalho de A. Meyer et al., 2006.

No sistema trigeminal os neurônios aferentes primários possuem morfologia pseudounipolar que correspondem a um único axônio que se divide em um ramo periférico e um ramo central (THALAKOTI et al., 2007), e os corpos celulares dos aferentes nociceptivos estão localizados no gânglio trigeminal. Do gânglio trigeminal, os aferentes primários projetam-se ao tronco cerebral onde estão os núcleos trigeminiais. Esse complexo trigeminal é composto

pelo núcleo sensorial principal, núcleo mesencefálico, núcleo motor e o pelo núcleo do trato espinhal do trigêmeo, este último sendo subdividido em três subnúcleos: oral, interpolar e caudal (Figura II) (SESSLE, 2005; 2016; CAIRNS, 2010; CAIRNS; REN; TAMBELI, 2014; CHICHORRO; PORRECA; SESSLE, 2017; LAVIGNE; ). A subdivisão desse complexo produz uma variedade de impulsos advindos dos tecidos periféricos ou de regiões cerebrais intrínsecas, juntamente com o circuito dentro e entre núcleos e subnúcleos, proporcionando um substrato para inúmeras interações (SESSLE et al., 2005; LAVIGNE e SESSLE et al., 2016; CHICHORRO; PORRECA; SESSLE, 2017).

Figura II - Representação da área de atuação via nociceptiva trigeminal no tronco encefálico.



Representação da via somatossensorial da face e boca. Projeção de aferentes primários do trigêmeo (via gânglio V) para neurônios de segunda ordem no tronco cerebral (complexo nuclear sensorial). Esses neurônios podem enviar projeções para os níveis mais altos do cérebro.

Fonte: Adaptada de Silverthorn, 2017.

O subnúcleo caudal do trato espinhal do trigêmeo é a principal região de transmissão de informações nociceptivas oriundas da região orofacial que ocorrem nas projeções das fibras A $\delta$  e C. Esse subnúcleo é considerado análogo ao corno dorsal da medula espinhal por apresentar estruturas laminadas e células morfológicamente semelhantes. Ademais, essa região do tronco cerebral apresenta grande concentração de mediadores químicos (como substância P e glutamato) e receptores (NDMA, neuroquinina) relacionados com a transmissão nociceptiva, bem como mediadores químicos envolvidos na modulação da dor, como 5-hidroxitriptamina (5-HT), encefalina e ácido gama-aminobutírico (GABA) (SESSLE, 2005; 2006). Vale ressaltar, que os aferentes nociceptivos primários fazem sinapse com neurônios de 2<sup>a</sup> ordem a partir dessa região transmitindo a informação nociceptiva ao tálamo (MERRILL, 2007; CAIRNS, 2010; LAVIGNE; SESSLE, 2016; LAVIGNE; SESSLE, 2016).

Diferentes tipos de neurônios de segunda ordem estão presentes no núcleo do trato espinhal, como os nociceptivos específicos (NS), os de ampla faixa dinâmica (WDR) e os receptores mecânicos de baixo limiar (LTM). Os NS são sensibilizados exclusivamente por estímulos nocivos, já os LTM respondem somente a estimulação tátil inócua. Os neurônios WDR, no entanto, são ativados desde estímulos inócuos até nocivos. Esses neurônios, quando ativados, transmitem os impulsos para diferentes regiões do tálamo. O tálamo é um importante centro de integração e retransmissão de estímulos nociceptivos. Assim, fibras talâmicas projetam-se ao córtex, estabelecendo sinapses de terceira ordem com neurônios em áreas corticais somatossensoriais que discriminam a dor. No córtex somatossensorial, os sinais são processados para prover a detecção e localização de estímulos tácteis, térmicos e nociceptivos (SESSLE, 2005; 2006; LAVIGNE; SESSLE, 2016).

A partir das conexões talâmicas e corticais com o sistema límbico (amígdala, hipotálamo, hipocampo, giro do cíngulo) há o desencadeamento do componente emocional da dor, que gera ao paciente o sofrimento e a busca pelo tratamento, sendo apresentado ao clínico através do comportamento doloroso, que provoca todas as consequências sócio-econômico-emocionais das dores orofaciais (SESSLE, 2005; SCHAPPERT; BURT, 2006; DE FELICE; OSSIPOV, 2016b).

### **2.3 Interação entre a periodontite e a dor**

A compreensão da relação intrigante entre a periodontite crônica e a dor, que ainda hoje não está bem esclarecida, começou a ser estudada por Griesbacher; Sutliff e Lembeck, em 1994. Tais pesquisadores realizaram um estudo induzindo edema de pata em ratos através da inoculação da bactéria *Porphyromonas gingivalis*. Esses autores desconfiaram que a presença de tal bactéria na doença periodontal poderia estar relacionada com sintomas álgicos, haja vista que várias enzimas anteriormente isoladas da *P. gingivalis* foram relatadas como possuindo atividade de liberação de cininas. Tais enzimas poderiam ser responsabilizadas por sintomas inflamatórios e dolorosos na periodontite. Os pesquisadores injetaram um extrato de *P. gingivalis* (EPG) na pata traseira de ratos e constataram que houve um aumento do volume nas patas desses animais. Realizaram também comportamento nociceptivo que promoveu uma resposta aumentada à dor, comparado aos animais normais. Levantou-se, portanto, a hipótese de que haveria uma relação entre a periodontite e a dor. Os autores ainda estudaram o envolvimento do receptor B2 de bradicinina no mecanismo de ação envolvido nesse processo,

indicando, portanto, que a dor periférica decorrente da periodontite, pode estar relacionada a efeitos inflamatórios das cininas.

Estudos de Brennan et al. (2008) e Durham et al. (2013), em humanos, que avaliaram interferência da periodontite na qualidade de vida, constataram que a presença de dor e desconforto causaram impactos negativos na vida de pacientes diagnosticados com essa doença. Concluíram que há uma correlação positiva entre a presença gengivite e perda de inserção com a experiência de dor/desconforto. Mostraram também que quanto maior a gravidade da doença, maior experiência de dor /desconforto.

Em quatro estudos de revisão de literatura, avaliou-se a relação entre a dor e doença periodontite. De Avila et al., em 2014, investigaram a relação entre os níveis de neuropeptídeo substância P na doença periodontal e a dor crônica, e constataram que a substância P é expressa na doença periodontal durante o processo inflamatório, e é um dos fatores responsáveis pela reabsorção óssea. A persistência dessas substâncias poderia ser suficiente para estimular a inflamação em tecidos susceptíveis e causar dor. Miranda-Rius et al. (2018) realizaram uma pesquisa sobre periodontopatias que levam ao desconforto periodontal, e concluíram que a periodontite crônica geralmente é indolor, mas pode causar dor incômoda episódica ou persistente devido à inflamação ou infecção de baixo grau.

Ferreira et al. (2017), em uma pesquisa de revisão utilizando 25 estudos, demonstraram que a doença periodontal está associada a um impacto negativo na qualidade de vida comprometendo aspectos relacionados à função e à estética. Os resultados correlacionaram à maior capacidade de a doença periodontal exercer impacto negativo na qualidade vida dos indivíduos quanto maior for a gravidade da doença. Concluíram, entretanto, que não há correlação positiva entre a periodontite e a dor.

Gaurilcikaite; Renton; Grant, em 2017, enfocando o paradoxo da doença periodontal ser indolor, sugeriram que haja um conjunto de interações entre bactérias periodontais e células hospedeiras e outros fatores liberados na lesão tecidual que são direta ou indiretamente inibidos, resultando em hipoalgesia. Admitem que há diversas evidências de que a periodontite é caracterizada por um acúmulo de fatores classicamente pró-algésicos de bactérias e de células hospedeiras. No entanto, acreditam que vários mecanismos de inibição ou inativação podem prevenir a sensibilização inflamatória das fibras.

Abd El-Aleem; Morales-aza; Donaldson, em 2004, suspeitaram que a doença periodontal, tal como a artrite, poderia apresentar mudanças na nocicepção com alteração da expressão de genes neuronais pró-inflamatórios como a substância P e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP). Esses autores avaliaram a expressão gênica desses

neuropeptídeos após a indução da doença periodontal com injeção de lipopolissacarídeos adjacentes ao segundo molar direito de ratos. Após a eutanásia, foram removidos o gânglio trigeminal dos lados direito e esquerdo e o cérebro. Como resultado, obtiveram uma expressão gênica aumentada de tais neuropeptídios na divisão mandibular do nervo trigêmeo, no lado ipsilateral da indução da injeção. Inferiram que o aumento da expressão gênica de Substância P e do CGRP pode estar relacionado apenas com o processo inflamatório, e que a periodontite não altera a nocicepção em ratos e, tampouco, em humanos.

Suzuki et al., em 2017, afirmaram que a periodontite é acompanhada de perda óssea alveolar e inflamação progressiva sem dor. Os autores utilizaram um modelo animal de inflamação periodontal induzida por ligadura, e sugeriram que o mecanismo da ausência de dor nesse modelo se dá devido ao fato de que a *P. gingivalis*, em macrófagos no tecido gengival, inibem a liberação e a produção de óxido nítrico (NO), pela via do NF-kB, o que, provavelmente, resulta na ausência de dor periodontal.

Os mecanismos pelos quais ocorrem as alterações neurais na doença periodontal, porém, ainda não estão esclarecidos. Portanto, a relação entre a dor e doença periodontal permanece dúbia carecendo de mais estudos que contemplem o tema. Dentro dessa ideia, estudos que vislumbrem elucidar a neurodinâmica das vias aferentes da nocicepção e da dor na periodontite mostram-se um interessante caminho para compreender qual a verdadeira relação entre a periodontite e a dor.

## 2.4 TRPV1

Para ocorrer a transdução do potencial de ação, inúmeros receptores e canais, localizados nas terminações nervosas livres e nos terminais sinápticos são ativados (HUNG; TAN, 2018). A família dos receptores de potencial transitório (TRP) atuam como sensores de temperatura e estímulos nocivos e estão envolvidos no desenvolvimento de dor patológica, especialmente dor inflamatória (RAMSEY; DELLING; CLAPHAM, 2006; JULIUS, 2013).

O TRPV1 é um membro da família TRPV, anteriormente chamado de VR1. É um receptor que possui um canal de cátion e é expresso por neurônios sensoriais primários da via da dor, que foi clonado em 1997 e identificado como sensível à capsaicina (vaniloide) e ao aumento da temperatura na faixa nociva (acima de 43° C) (CATERINA et al., 1997; 2000). Estudos subsequentes confirmaram os achados anteriores (TOMINAGA; CATERINA, 2004) e demonstraram que o canal TRPV1, como um canal polimodal, também é responsivo às alterações no pH, aos prótons e a outros vaniloides (por exemplo, vanilotóxicas e anandamida)

(HWANG et al., 2000; ROSS, 2003; SESSLE, 2005; SIEMENS et al., 2006; DHAKA et al., 2009; ANEIROS et al., 2011). Esse canal excitatório é expresso pelos neurônios sensoriais da via da dor, quase que exclusivamente nas fibras C, indicando seu papel marcador para estímulos nocivos ( KOBAYASHI et al., 2005; SIEMENS et al., 2006).

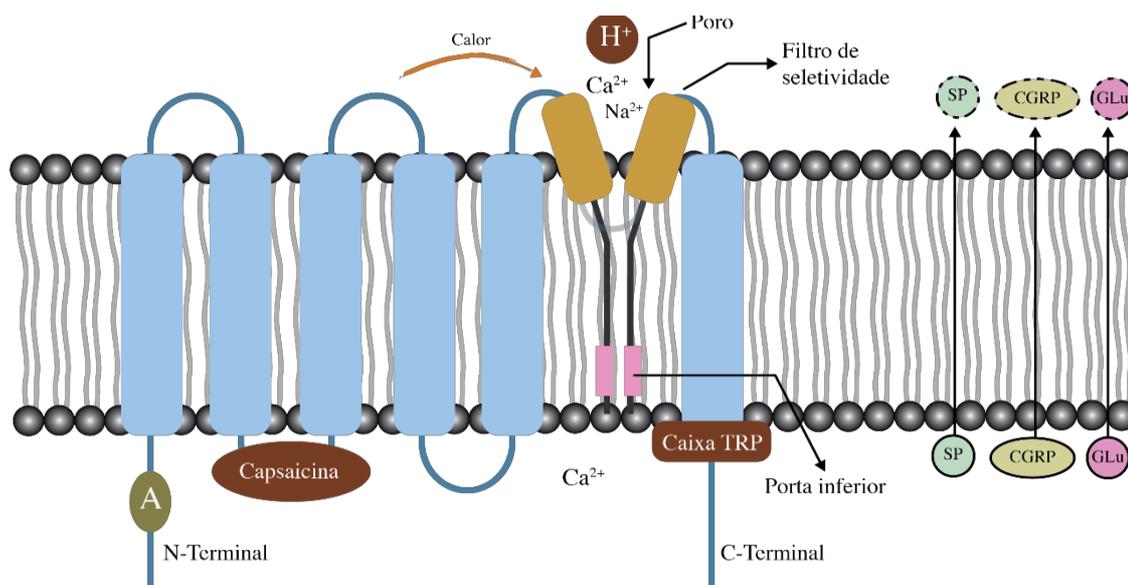
Estruturalmente, o TRPV1 é composto por quatro subunidades de proteína idênticas montado em um canal funcional e permeável a cátions (CAO et al., 2013). Cada subunidade contém seis segmentos transmembrana, com o poro localizado entre os domínios 5 e 6 da membrana, e ambos os domínios N-terminal e C-terminal situados no citosol (HAZAN et al., 2015; JARDÍN et al., 2017). Existem dois pontos de restrição no poro, definidos como o filtro de seletividade e a porta inferior. Quando inativo, essas estruturas ficam constrictas, e a passagem da condução iônica é bloqueada. A ligação de produtos químicos, como a toxinas e estímulos térmicos, na porção extracelular do poro promove mudanças conformacionais importantes no TRPV1, permitindo a entrada de sódio e cálcio na célula (CAO et al., 2013).

Intracelularmente existe uma vesícula hidrofóbica, entre os domínios S3 e S4, chamada de bolsa vaniloide, que permite que pequenas moléculas vaniloides (por exemplo, a resiniferatoxina e capsaicina) possam atravessar a membrana plasmática para se ligar alostericamente regulando a ativação do canal (Figura III) (CAO et al., 2013; GERON; HAZAN; PRIEL, 2017) O amino ou (N)-terminal apresenta domínios anquirina que estão envolvidos nas interações entre as proteínas do receptor com as proteínas intracelulares (JUNG et al., 2002). A porção carboxila (C)-terminal do receptor exibe um domínio TRP importante para a tetramerização das subunidades, detecção de temperatura e modulação da abertura do canal (CLAPHAM; RUNNELS; STRÜBING, 2001; VLACHOVÁ et al., 2003; GARCIA-SANZ et al., 2004; 2007; RAMSEY; DELLING; CLAPHAM, 2006; BRAUCHI et al., 2006). Além disso, em condições fisiológicas, o TRPV1 demonstrou ser co-expresso com PKC  $\beta$  II em um subgrupo de neurônios nociceptivos, tornando esses neurônios hipersensíveis, aumentando acentuadamente as respostas desse receptor por fosforilação (LI; HASAN; ZHANG, 2014; ZHANG, 2015). Na presença de inflamação, os mediadores inflamatórios diminuem os limiares mecânicos e térmicos dos neurônios sensoriais expostos, em um processo denominado de sensibilização (WESSELDIJK, 2008).

O TRPV1, além de contribuir para a geração da dor em condições fisiológicas, possui papel relevante para a geração de potenciais de ação durante a inflamação. Em resposta a vários mediadores inflamatórios, como os eicosanoides (por exemplo, prostaglandina E2), neuropeptídeos (por exemplo, substância P e bradicinina), aminoácidos excitatórios (por exemplo, glutamato), leucotrienos e citocinas (por exemplo, TNF-  $\alpha$ , IL-6 e INF-  $\gamma$ ), ocorre

uma diminuição dos limiares de ativação dos nociceptores. Essa condição leva a comportamentos patológicos de dor, como hiperalgesia térmica, dor espontânea e alodinia mecânica (CATERINA et al., 2000; BHAVE; GEREAU, 2004; MA; QUIRION, 2007; LIS et al., 2017).

Figura III - Estrutura molecular do receptor TRPV1.



O canal TRPV1 apresenta de 6 domínios transmembrana. Entre os domínios S5 e S6, forma-se o poro do canal que possui dois domínios intracelulares em cada extremidade da molécula: carboxila ou (C) - terminal e amino ou (N)-terminal. Nesta figura, estão representados também os sítios de ligação para capsaicina (bolsa vaniloide) entre os domínios S2 e S3, calor e ativação por prótons ( $H^+$ ) que permitem a entrada de cálcio e sódio na célula. Na região N-terminal contém local de ativação da anquirina (A), e na região no C-terminal contém a caixa TRP, essencial para a abertura do canal. O aumento do cálcio intracelular pode resultar em ativação de isoformas de PKC que podem aumentar a liberação de neuropeptídeos. Além disso, o aumento do cálcio intracelular pode ativar uma série de outras enzimas, incluindo a fosfolipase A2 e as proteínas quinases dependentes de cálcio/calmodulina (CaM quinases). A fosfolipase A2 promove a liberação de ácido araquidônico a partir de triglicerídeos de membrana e a produção de prostaglandinas que influenciam liberação de mais mediadores inflamatórios. As quinases fosforilam canais iônicos e proteínas sinápticas que pode aumentar ainda mais a liberação dos neurotransmissores (SP, CGRP e GLu).

Fonte: Própria autora, baseado em Richardson, 2002 e Cao et al., 2013.

Ademais, após sua ativação, o TRPV1 também pode induzir a secreção de neuropeptídeos, incluindo a substância P e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) pelos nociceptores (WICK et al., 2006; JARDÍN et al., 2017). Os neuropeptídeos secretados, então, se ligam a receptores específicos expressos nas células circundantes, como os linfócitos, as células dendríticas, os mastócitos e os macrófagos, que desencadeiam uma série

de reações envolvidas na resposta imune (RICHARDSON, 2002; ASSAS; PENNOCK; MIYAN, 2014). A ativação dos TRPV1 também está relacionada com o aumento da facilitação da neurotransmissão de glutamato, devido ao influxo de íons  $\text{Ca}^{2+}$  nos neurônios pós-sinápticos em diversas estruturas encefálicas (MARINELLI et al., 2002; STAROWICZ et al., 2007; XING; LI, 2007). Desse modo, TRPV1 participa do processo conhecido como inflamação neurogênica e no desenvolvimento da dor inflamatória (DAVIS et al., 2000; CATERINA et al., 2000; ROOSTERMAN et al., 2006).

No sistema trigeminal foi demonstrada que a expressão de TRPV1 é principalmente encontrada nos neurônios pequenos e médios do GT e na subdivisão caudal do núcleo espinal do nervo trigêmeo. Esse conceito do envolvimento do receptor TRPV1 na atividade funcional do compartimento protopático do sistema sensorial trigeminal humano demonstra o processamento e a neurotransmissão nos estímulos térmicos e da dor na região orofacial (QUARTU et al., 2016).

De fato a sensibilização e ativação do TRPV1 em nociceptores periféricos pode levar à transmissão dos sinais nocivos ao sistema nervoso central e, conseqüentemente, à produção de sensações desagradáveis e dolorosas avisando ao corpo da ameaça potencialmente prejudicial (PATAPOUTIAN; TATE; WOOLF, 2009; JULIUS, 2013).

## **2.5 Mecanismo de ação dos opioides na modulação da dor**

Os opioides endógenos compõem um dos principais sistemas envolvidos na modulação da dor. Por esse motivo são amplamente utilizados e eficazes para o tratamento da dor severa (AL-HASANI; BRUCHAS, 2011; CLARKE et al., 2015). Opioides endógenos como endorfinas, dinorfinas e encefalinas se ligam aos receptores  $\mu$  (mu),  $\kappa$  (kappa) e  $\delta$  (delta), chamados também de MOR, KOR e DOR, respectivamente, presentes em células neurais e inibem a transmissão pré-sináptica de mediadores como: noradrenalina (NE), acetilcolina, glutamato e substância P, no corno dorsal da medula espinal e subnúcleo caudal do trato espinal do nervo trigêmeo (CANO et al., 1999; BINGEL; TRACEY, 2008; LITTLEJOHN; GUYMER; NGIAN, 2016; CHICHORRO; PORRECA; SESSLE, 2017).

Os opioides endógenos foram relacionados com as vias inibitórias através da descoberta do fenômeno analgésico do placebo. Em um estudo clássico, realizado por Levine et al., no ano de 1978, o efeito da naloxona, um importante antagonista opioide, foi avaliado na dor pós-operatória com intuito de examinar a hipótese de que as endorfinas mediavam a analgesia do placebo. No referido estudo, nos pacientes submetidos à extração dos terceiros

molares inferiores impactados, foram administrados naloxona ou placebo, como segundo medicamento, após uma primeira administração de placebo. A dor foi avaliada através da escala visual analógica (EVA). Nos pacientes cuja dor foi reduzida com placebo, e que receberam naloxona como segundo medicamento, a dor foi significativamente maior do que aqueles que apenas receberam placebo como segundo medicamento. Assim, o aumento da dor relatada produzida pela naloxona explica que a analgesia do placebo é mediada pela liberação de opioides endógenos.

Os receptores opioides foram reconhecidos pela primeira vez em 1967 por Martin et al., que descobriram os locais específicos nos quais os opioides exerciam suas ações *in vivo*. Em meados de 1992, dois grupos de pesquisadores conseguiram clonar o receptor  $\delta$  (DOR). Eles identificaram um novo membro da família de receptores em hélice de sete transmembranas acoplados à proteína G (GPCRs) que possuía propriedades farmacológicas típicas (EVANS et al., 1992; KIEFFER et al., 1992). Mais tarde, o receptor  $\mu$ -opioide (MOR), principal receptor responsável pelos efeitos analgésicos opioides clássicos, e o receptor  $\kappa$ -opioide (KOR) também foram clonados. Estes receptores opioides foram categorizados como membros da subfamília rodopsina, pertencentes à superfamília de GPCRs (MENG et al., 1993; MINAMI et al., 1993).

Os receptores opioides são proteínas de membrana que compartilham uma estrutura de sete hélices transmembranares, e realizam a transdução do sinal celular pela ativação de proteínas heterotriméricas (proteína G) no meio intracelular (CHEN et al., 2013; HOELZ et al., 2013). Quando estimulados, ocorre a inibição da enzima adenilato ciclase, reduzindo o nível intracelular de adenosil monofosfato cíclico. Com isso há o fechamento dos canais de cálcio voltagem dependentes nas terminações pré-sinápticas, reduzindo a liberação de neurotransmissores e ainda promovendo a ativação dos receptores, porém não os canais de  $K^+$  na membrana pós-sináptica. Isso causa uma hiperpolarização desse neurônio, bloqueando parcialmente a transmissão do estímulo doloroso. Essa ativação, mediada pela interação do agonista no domínio extracelular do receptor, se propaga no meio intracelular produzindo a analgesia (JORDAN; DEVI, 1999).

O receptor MOR é expresso no gânglio trigeminal e modulado pela inflamação (FRISTAD; BERGGREEN; HAUG, 2006; LEE et al., 2016; ZHANG et al., 2014). As citocinas pró-inflamatórias, como: IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6 e TNF- $\alpha$ , induzem o aumento da expressão de MOR em células neuronais e não neuronais (BÖRNER; HÖLLT; KRAUS, 2002; BORNER, 2004; KRAUS et al., 2001; VIDAL et al., 1998). Tal aumento da densidade de MOR foi proposto como um dos principais mecanismos responsáveis pelos efeitos anti-hiperalgésicos pronunciados pelos opioides periféricos em condições inflamatórias (ZOLLNER et al., 2003).

Receptores opioides kappa (KOR) são expressos em nociceptores, e sua ativação pode reduzir a neurotransmissão da dor da periferia para o sistema nervoso central (JAGLA; MARTUS; STEIN, 2014; LABUZ et al., 2007; WEIBEL et al., 2013). Estudos de Aita et al. (2010) verificaram que o sistema receptor dinorfina-kappa (KOR) regula a proliferação glial em modelos animais que simulam a dor neuropática do trigêmeo. Concluíram que KOR tem papel na proliferação celular após a ligadura parcial do nervo infraorbital, aumentando a proliferação celular em três áreas distintas da via aferente do trigêmeo: núcleo principal do trigêmeo, zona de entrada da raiz do trigêmeo e gânglio trigeminal.

Em um estudo usando um modelo de dor inflamatória, Berg et al. (2011) demonstram que a ativação de KOR através do agonista KOR (-)-(trans)-3,-dicloro-N-metil-N-[2-(1-pirrolidinil)ciclo-hexilo] benzeneacetamida (U50488) produz uma forte inibição da alodinia térmica estimulada por prostaglandina E2 (PGE<sub>2</sub>) quando administrado diretamente na superfície plantar da pata traseira de rato em doses que não atuam sistemicamente.

Após a descoberta dos receptores, os pesquisadores identificaram os genes precursores dos peptídeos opioides no início dos anos 80. Millan (2002), Ossipov et al. (2010) e Sheng et al. (2018) relataram que os peptídeos opioides envolvidos na modulação da nocicepção, incluindo encefalinas, endorfinas e dinorfinas, são originados a partir de precursores proteicos distintos e podem ativar diferentes receptores. O complexo mecanismo de interação dos receptores opioides e peptídeos opioides endógenos tem importância para a compreensão das vias inibitórias da dor, bem como para os mecanismos de eficácia analgésica dos opioides, abrindo novas perspectivas para o entendimento da possível analgesia exibida na periodontite.

## **2.6 Modelos experimentais de avaliação da dor**

### ***2.6.1 Hipernocicepção induzida por formalina***

O reconhecimento e a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos das dores orofaciais podem ser muito úteis no manejo das condições clínicas. Assim, os modelos animais contribuíram grandemente para o conhecimento atual da fisiopatologia da dor orofacial (CLAVELOU et al., 1995).

O teste de formalina orofacial em roedores é um modelo pré-clínico bem estabelecido para investigar a eficácia de compostos analgésicos na região facial através da ativação de fibras do nervo trigêmeo (CLAVELOU et al., 1989; LUCCARINI et al., 2006). O

teste é baseado em um estímulo químico (formalina), que, ao induzir o dano tecidual, simula a dor aguda pós-lesão em humanos. Durante o teste, podem-se observar duas fases que estão associadas a, pelo menos, dois mecanismos parcialmente distintos de nocicepção. A primeira fase é de curta duração (fase neurogênica), seguida de uma fase mais prolongada (tônica) (fase inflamatória). A fase inicial está associada à estimulação direta fibras C, enquanto a segunda fase reflete a integração entre sinalização periférica (nociceptores) e central (medula espinal/tronco encefálico) (DALLEL et al., 1995; RABOISSON; DALLEL, 2004).

Clavelou et al., em 1995, sugeriram práticas para a padronização do teste de formalina orofacial. Eles verificaram a relação entre a concentração da formalina e a quantidade de tempo que os ratos passaram coçando o lábio. No estudo, os animais receberam uma injeção subcutânea 50 µl de formalina diluída ou salina (0,9%) no lábio superior direito, usando como referência a asa lateral ao nariz. As soluções foram preparadas nas concentrações 0,2%, 0,5%, 1,5%, 2,5%, 5% e 10%. Após a injeção, o rato foi observado por um período de 45 min. O tempo de aferição foi dividido em 15 blocos de 3 min. A pontuação foi determinada para cada bloco, medindo-se o número em segundos (amplitude da resposta) que o animal passou coçando a área injetada com a pata anterior ou posterior ipsilateral. Todas as concentrações de formalina de 0,2% a 10% induzem a 1ª fase da resposta, que não durou além do 3º min após a injeção. A segunda fase da resposta só foi ativada nas concentrações iguais ou maiores que 1,5%. A amplitude das respostas atingiu um máximo na concentração de 1,5%. Eles concluíram que a injeção s.c. de formalina, diferentemente da solução salina, evoca episódios de fricção estereotipado no local, comportamento que sinaliza a resposta nociceptiva.

Raboisson e Dallel, em 2004, investigaram os efeitos comportamentais e histológicos da injeção subcutânea de formalina no lábio superior de ratos. Eles corroboraram com o estudo anterior, observando que há uma correlação positiva entre a amplitude da resposta e a concentração de formalina, pelo menos até 2,5%. Além disso, constataram que o aumento da concentração de formalina causou um agravamento dos sinais histológicos de inflamação tecidual.

Chichorro; Lorenzetti; Zampronio, em 2004, caracterizaram alguns dos mecanismos e mediadores envolvidos na nocicepção orofacial desencadeada pela injeção de formalina no lábio superior do rato, utilizando diferentes concentrações de formalina. A duração da fricção facial foi eliciada com uma resposta baixa, considerada não nociceptiva até 0,63%, e alta na concentração mais elevada de 2,5%. Os resultados também indicaram o envolvimento de diversos mediadores que contribuem significativamente com a nocicepção orofacial induzida por formalina, tais como: bradicinina, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, aminas simpáticas e

prostaglandinas. O teste de formalina orofacial é, portanto, considerado um método confiável de reproduzir e quantificar a nocicepção na região orofacial trigeminal em ratos.

### ***2.6.2 Hipernocicepção mecânica por Von Frey elétrico***

Vários modelos animais de estudos da dor buscaram mimetizar as condições de dor aguda e crônica em humanos, a fim de estudar os mecanismos da dor aguda e persistente em animais (DEUIS; DVORAKOVA; VETTER, 2017). Os monofilamentos de Von Frey, embora inicialmente projetados para teste de sensibilidade tátil em humanos, (CHICHORRO; LORENZETTI; ZAMPRONIO, 2004b; SEMMES et al., 1960; JENSEN et al., 1986; BELL-KROTOSKI; TOMANCIK, 1987) passaram a ser utilizado também para ensaios pré-clínicos para avaliar a fisiopatologia da dor e a influência de drogas sobre a sensibilidade nociceptiva em animais (CUNHA et al., 2004; DEUIS et al., 2013; RODRIGUES et al., 2014; CHAVES et al., 2018).

O teste do Von Frey é utilizado amplamente em modelos de nocicepção na superfície plantar da pata traseira enquanto os animais estão em uma superfície metálica gradeada. A sensibilidade mecânica é determinada por uma resposta de retirada da pata à sondagem dos filamentos (CUNHA et al., 1991; 1992; 2004; 2008; DEUIS et al., 2014; 2015). O uso do Von Frey em outras regiões corporais, como superfície dorsal da pata traseira, abdome e cauda, também foram relatados na literatura (MINETT; EIJKELKAMP; WOOD, 2014; DEUIS; DVORAKOVA; VETTER, 2017).

Na região orofacial, pesquisas envolvendo a dor inflamatória são conduzidas avaliando a hipernocicepção mecânica por Von Frey, principalmente na região articular (REN, 1999; RODRIGUES et al., 2014; ALVES et al., 2018; CHAVES et al., 2011; 2018), mas também em outras regiões da face, com menor frequência, como lábio, gengiva e pele da região maxilar (LIS et al., 2017; SUZUKI et al., 2017; ARAYA et al., 2017; WATASE et al., 2018). Esses estudos foram principiados por Ren, em 1999, que desenvolveu um método para testar o limiar nociceptivo mecânico e alodinia na região orofacial com intuito de melhorar compreensão dos mecanismos dessa região. Ele injetou completo adjuvante de Freund (CFA), um agente inflamatório, na região da pata, no tecido peritemporomandibular e na pele da região perioral e obteve uma alodinia mecânica significativa nas 3 regiões. O método proposto utilizou os filamentos de von Frey (monofilamentos de Semmes-Weinstein (SW)) e forneceu uma forma simples para avaliar sensibilidade mecânica da região orofacial de forma irrestrita, já que o rato permanece acordado e reduz fatores de confusão relacionados ao suporte

de peso e gravidade do equipamento. Esse modelo possibilitou o estudo dos mecanismos da dor orofacial, como a dor persistente associada a distúrbios temporomandibulares.

A presença e a extensão de comportamentos aversivos nas respostas ocasionadas por estímulos mecânicos são tipicamente determinadas usando o Von Frey em filamentos ou eletrônico (DEUIS; DVORAKOVA; VETTER, 2017). A técnica eletrônica consiste na aplicação, com força crescente, de um cone rígido acoplado ao equipamento elétrico até que a resposta de movimento de retirada seja eliciada (CHAVES et al., 2011; DEUIS et al., 2014; 2015; ). No Von Frey eletrônico, a força na qual esta resposta ocorre é gravada automaticamente pelo aparelho, o qual é baseado em um sistema de transdução digital que registra a força máxima aplicada ao animal até o momento de sua resposta de retirada da cabeça (*head-withdrawal threshold*) e expressa em gramas (g) (DENADAI-SOUZA et al., 2009).

Em estudos experimentais na articulação temporomandibular (ATM), os animais são submetidos a um treinamento por um período de quatro dias que antecedem a indução e aferição da nocicepção na região. No quinto dia, os animais passam por um período de ambientação de 15-30 minutos em caixas de acrílico para adaptação e registra-se um valor basal (média de três medidas) da resposta do animal ao estímulo mecânico antes da indução da artrite. Após a indução da hipernocicepção articular, também se realiza a média de três medidas consecutivas da retirada de cabeça (DENADAI et al., 2009; CHAVES et al., 2011).

Suzuki et al., 2017, utilizou o Von Frey eletrônico em um modelo de periodontite em camundongos, com indução através de uma ligadura no colo do segundo molar superior direito e inoculação de *Porphyromonas gingivalis*. Os testes com o analgesímetro digital foram realizados na gengiva com os animais sob anestesia leve, e não observaram mudanças significativas no limiar de retirada de cabeça. Os resultados remeteram diminuição do limiar de retirada da cabeça quando os níveis de óxido nítrico no tecido gengival foram aumentados após aplicação do L-arginina (substrato do óxido nítrico sintase) e neutralização receptor de quimiocina CXC tipo 4 (CXCR) no modelo de periodontite.

Os modelos experimentais baseados em testes mecânicos permitem a avaliação do aumento da sensibilidade do nociceptor a estímulos inócuos (alodinia) ou nocivos (hiperalgesia). Particularmente, o teste de Von Frey elétrico é usado para avaliar, através do estímulo mecânico inócuo e crescente (alodinia mecânica), a sensibilidade tecidual provocada por estímulo (LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001a;b; DEUIS; DVORAKOVA; VETTER, 2017).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Realizar caracterização neuroquímica das vias da dor em ensaio pré-clínico da periodontite em ratos.

#### 3.2 Objetivos Específicos

1. Analisar perda óssea alveolar na hemiarcada de ratos submetidos à periodontite;
2. Quantificar as citocinas  $TNF\alpha$ ,  $IL-1\beta$ ,  $IL-8$ , e  $PGE_2$  em tecido gengival de ratos submetidas à periodontite;
3. Avaliar resposta nociceptiva mecânica por Von Frey elétrico em ratos submetidos à periodontite;
4. Determinar alteração do comportamento nociceptivo orofacial desencadeado pela injeção de formalina em ratos submetidos à periodontite;
5. Quantificar os níveis dos neuropeptídeos peptídeo relacionado ao gene da calcitonina ( $CGRP$ ), substância P e do aminoácido excitatório glutamato através na gengiva, gânglio trigeminal e subnúcleo caudal de ratos submetidos à periodontite;
6. Avaliar presença dos receptores vaniloides ( $TRPV1$ ) através de análise por imunohistoquímica no gânglio trigeminal de ratos submetidos à periodontite;
7. Investigar por qRT-PCR a expressão do RNAm dos receptores opioides  $\mu$  e  $\kappa$  no tecido gengival e gânglio trigeminal de ratos submetidos à periodontite;
8. Avaliar os receptores opioides  $\mu$  e  $\kappa$  neuronais por *Western blotting* no gânglio trigeminal de ratos submetidos à periodontite;

#### **4 CAPÍTULO 1: “Caracterização Neuroquímica das Vias da Dor em Ensaio Pré-clínico de Periodontite”**

Dissertação baseada no Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal do Ceará que regulamenta o formato alternativo para trabalhos de conclusão de Mestrado (Dissertações) e permite a inserção de artigo científico de autoria ou coautoria do candidato.

Título em inglês: **“Neurochemical characterization of pathways of pain in a pre-clinical assay of periodontitis”.**

Este artigo seguiu as normas de publicação do periódico –  
*The Journal of Pain* (ISSN 1526-5900).

## **Caracterização Neuroquímica das Vias da Dor em Ensaio Pré-clínico de Periodontite**

Joanna Trycia Magalhães Alexandre<sup>a</sup>; Mirna Marques Bezerra<sup>a, b</sup>; Sebastião Carlos de Sousa Oliveira<sup>b</sup>; Tiago Sampaio dos Reis<sup>b</sup>; Dina Andressa Martins Monteiro<sup>b</sup>; Ariely Marques Oliveira de Meneses<sup>c</sup>; Nayara Sousa Alves<sup>b</sup>; Isabela Ribeiro Pinto<sup>b</sup>; Luzia Hermínia Teixeira Sousa<sup>d</sup>; José Jackson do Nascimento Costa<sup>b</sup>; Conceição da Silva Martins<sup>e</sup>; Virgínia Claudia Carneiro Girão<sup>e</sup>; Hellíada Vasconcelos Chaves<sup>a, c</sup>.

<sup>a</sup> Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Ceará. Avenida Comandante Maurocéllo Rocha Pontes, 100 Derby, Sobral, Ceará, Brasil. Cep: 62.042-280. (jtrycia@yahoo.com.br)

<sup>b</sup> Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará. Avenida Comandante Maurocéllo Rocha Pontes, 100 Derby, *Campus* Sobral, Sobral, Ceará, Brasil. Cep: 62.042-280. (mirna@ufc.br; csosebastiao@gmail.com; tiago-sampaio1@hotmail.com; dandressa2@gmail.com; nayaranayvinsck@hotmail.com)

<sup>c</sup> Faculdade de Odontologia de Sobral, Universidade Federal do Ceará, Avenida Comandante Maurocéllo Rocha Pontes, 100 Derby, *Campus* Sobral, Sobral, Ceará, Brasil. Cep: 62.042-280. (helliadachaves@yahoo.com.br; ariely.meneses08@gmail.com)

<sup>d</sup> Programa de Pós-graduação em Odontologia. Universidade Federal do Ceará – *Campus* Porangabussu. Rua Delmiro de Farias, s/n - Rodolfo Teófilo, Cep: 60.430-170, Fortaleza, Ceará, Brasil. (luziaherminia@yahoo.com.br)

<sup>e</sup> Faculdade de Medicina, Departamento de Morfologia, Universidade Federal do Ceará – *Campus* Porangabussu. Rua Delmiro de Farias, s/n - Rodolfo Teófilo, Cep: 60.430-170, Fortaleza, Ceará, Brasil. (josycristophe@gmail.com; virginia.girao@ufc.br)

### **Autor de correspondência:**

Hellíada Vasconcelos Chaves

Universidade Federal do Ceará, Campus Sobral

CEP: 62010-590, Sobral, CE, Brasil

E-mail: helliadachaves@yahoo.com.br

Fone: +55 88-3611-2202 - Fax: +55 88-3611-8000

**DESTAQUES**

1. Perda óssea alveolar e mediadores inflamatórios na periodontite experimental (PE).
2. Resposta hipernociceptiva mecânica e química durante a PE.
3. Receptor TRPV1 em tecido neural na PE.
4. Neurotransmissores no estudo da sensibilização periférica e central na PE.
5. Mecanismos de inibição opioide dos receptores mu e kappa durante a PE.

## RESUMO

A periodontite é uma doença imunoinflamatória crônica com perda dental, e, apesar da extensa destruição tecidual, não há sintomatologia dolorosa, levantando questões sobre quais alterações neuronais ocorrem. Neste sentido, esse trabalho se propõe à caracterização neuroquímica das vias da dor em ensaio pré-clínico de periodontite (PE). Para tanto, a PE foi induzida em ratos *Wistar*, por ligadura nos 2º molares superiores esquerdos. Entre os dias 0 a 21 foi realizado análise de hipernocicepção mecânica (Von Frey). Para análise comportamental por formalina, nos dias 1, 3, 5, 7, 11, 14 e 21 os ratos receberam formalina 0,5% (sc) ou salina. Após avaliação nociceptiva com formalina, os animais foram eutanasiados e excisados: a maxila, a gengiva (GE), o gânglio trigeminal (GT) e o subnúcleo caudal (SC). Os parâmetros avaliados foram: perda óssea alveolar (POA); quantificação dos níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8 e PGE<sub>2</sub> na GE; quantificação dos níveis dos neurotransmissores: SP, CGRP e GLu na GE, GT e SC; imunohistoquímica do receptor TRPV1 no GT; expressão gênica dos receptores opioides  $\mu$  (MOR) e  $\kappa$  (KOR) na GE e GT e expressão proteica de MOR e KOR por *western blotting* no GT. No 11º dia de PE observou-se pico de reabsorção óssea; aumento das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8 e da PGE<sub>2</sub> na GE; redução do limiar de retirada de cabeça e retorno ao normal no 17º dia de PE; e aumento do comportamento nociceptivo evocado por formalina. Não houve diferenças nos níveis de SP, CGRP, GLu e imunomarcação para TRPV1. Na GE, a expressão gênica de MOR aumentou nos dias 7 e 11 da PE, e do KOR no 7º dia de PE. No GT, a expressão gênica e níveis de proteína do MOR aumentaram nos dias 11º e 14º, e do KOR aumentou no 11º dia PE. Sugere-se que PE evoca uma sensibilização periférica no 11º dia mediada por TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8 e PGE<sub>2</sub>, porém não aumenta TRPV1, nem altera a liberação de SP, CGRP e GLu. Concomitantemente, ocorre inibição endógena da dor pelos receptores opioides  $\mu$  e  $\kappa$  nas fibras aferentes primárias e no GT.

## PERSPECTIVA

A inter-relação entre periodontite e dor ainda não está esclarecida, pois, apesar de ser uma doença imunoinflamatória crônica com destruição tecidual gerando perda dentária, não há sintomatologia dolorosa. O conhecimento sobre os mecanismos neuronais envolvidos, ainda não estudados, são importantes para a compreensão da fisiopatologia e conduta clínica na doença.

**PALAVRAS-CHAVE:** Periodontite. Nocicepção. Inflamação. Opioides. Neuropeptídeos.

## INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença imunoinflamatória crônica de alta prevalência na população mundial, caracterizada por alterações histopatológicas irreversíveis que incluem a destruição do ligamento periodontal, do cemento radicular e a reabsorção do osso alveolar, que, quando não tratada, poderá culminar em perdas dentárias. A complexa patogênese da doença periodontal deve-se à estreita inter-relação entre o agente infeccioso (biofilme associado aos dentes) e a resposta imune inflamatória exacerbada do hospedeiro que promove destruição tecidual (PIHLSTROM; MICHALOWICZ; JOHNSON, 2005; GIANNOBILE, 2008; DUTZAN et al., 2015; SILVA et al., 2015).

A dor e a destruição tecidual normalmente se correlacionam em doenças crônicas, no entanto, em pacientes com periodontite, apesar de ser uma doença crônica com extensa destruição tecidual, classicamente não há sintomatologia dolorosa, exceto em casos agudos. (MIRANDA-RIUS; BRUNET-LLOBET; LAHOR-SOLER, 2018); GAURILCIKAITE; RENTON; GRANT, 2017). A relação entre a dor, ou a ausência dela, na periodontite não é completamente compreendida. Alguns autores sugeriram que a periodontite não parece estar associada à percepção de dor (DUMITRESCU et al., 2004; FERREIRA et al., 2017). Outros autores são mais taxativos e asseguram haver completa ausência de dor durante a periodontite (ABD EL-ALEEM; MORALES-AZA; DONALDSON, 2004; SUZUKI et al., 2017). Ferreira et al. (2017), em uma pesquisa de revisão sistemática, demonstraram que a doença periodontal está associada a um impacto negativo na qualidade de vida comprometendo aspectos relacionados à função e à estética, sugerindo, entretanto, não haver correlação positiva entre a periodontite e a dor.

Outra linha de pesquisa, entretanto, defende que há possibilidade de haver sintomatologia dolorosa durante a PE, haja vista que o periodonto contém abundantes terminações nervosas sensoriais (nociceptores) (MENGEL et al., 1988; MIRANDA-RIUS; DE AVILA et al., 2014; BRUNET-LLOBET; LAHOR-SOLER, 2018). Além disso, alterações de pH, alterações de temperatura, mediadores inflamatórios e endotoxinas presentes na periodontite podem ser suficientes para estimular os nociceptores nos tecidos periodontais e causar dor (LUTHMAN et al., 1989; GRIESBACHER; SUTLIFF; LEMBECK, 1994; DE AVILA et al., 2014). Em estudos que avaliam o impacto na qualidade de vida de pacientes com periodontite crônica, concluíram que há uma correlação positiva entre a severidade da doença e maior experiência de dor/desconforto, entretanto a dor foi avaliada através de

questionários de qualidade de vida (BRENNAN; SPENCER; ROBERTS-THOMSON , 2008; DURHAM et al., 2013).

Sabe-se que durante um processo infeccioso, a sensibilização dos nociceptores pode ser originada tanto através de componentes bacterianos bioativos e fatores de virulência, quanto de mediadores inflamatórios oriundos de células hospedeiras, como também de neurotransmissores que podem ser liberados antidromicamente pelas terminações nervosas aferentes, caracterizando inflamação neurogênica, tudo isso como resposta inflamatória à presença de micro-organismos (GYÖRFI; FAZEKAS; ROSIVALL, 1992; GAURILCIKAITE; RENTON; GRANT, 2017). Neste processo, ocorre o desenvolvimento de uma atividade contínua nas fibras nervosas aferentes, tornando-as mais sensíveis à estimulação, e até mesmo a estímulos que normalmente são inócuos, o que caracteriza a sensibilização periférica (CHICHORRO; PORRECA; SESSLE, 2017; WOLLER et al., 2017).

Ademais, sabe-se que a percepção da dor é dependente de vários mecanismos modulatórios que podem inibir ou facilitar a entrada nociceptiva, determinando a sensação dolorosa, bem como, a intensidade e após um evento nocivo (OSSIPOV et al., 2010). Os mecanismos pelos quais ocorrem as alterações neurais na doença periodontal ainda não estão esclarecidos. Portanto, a relação entre a dor e doença periodontal permanece dúbia carecendo de mais estudos que contemplem o tema. Neste sentido, este trabalho vislumbra a caracterização neuroquímica das vias da dor no modelo da periodontite experimental.

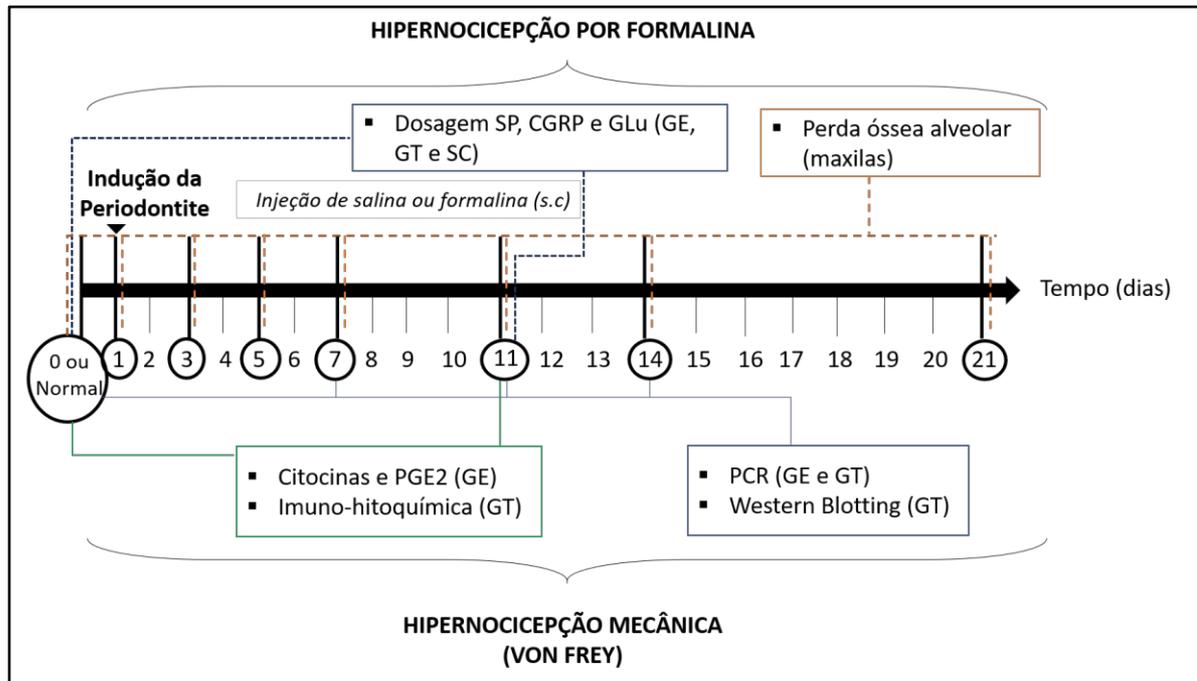
## **MATERIAS E MÉTODOS**

### **Animais**

Ratos *Wistar* (180-240 g) foram fornecidos pela Unidade de Cuidados de Animais da Universidade Federal do Ceará (UFC - Fortaleza, Brasil), foram alojados aleatoriamente em gaiolas plásticas apropriadas a  $23 \pm 2^\circ$  C com 12 horas de ciclo claro-escuro (06:00 às 18:00) no biotério setorial da UFC *Campus* Sobral e acesso à água e comida *ad libitum*. Os ratos foram alocados em grupos contendo seis animais e manipulados com cuidado especial para evitar alterações ambientais. O estudo foi conduzido de acordo com as diretrizes da Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) sobre o uso de animais de laboratório para investigações de dor experimental em animais conscientes (ZIMMERMANN MANFRED, 1983). Para realização dos testes experimentais utilizaram-se 6 animais por grupo, totalizando

156 animais (Figura 1). O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA) do Curso de Medicina da UFC (*Campus Sobral*) com número de protocolo **10/17**.

Figura 1 – Fluxograma geral do estudo.



Representação do delineamento do estudo. A organização dos grupos, tecidos e análises abordados na pesquisa estão apresentados na figura. A linha temporal representa o curso da periodontite, que foi avaliado nos ensaios de hipernociceção mecânica por Von Frey (0 ao 21 dia) e química evocada por formalina (1, 3, 5, 7, 11, 14 e 21 dias (círculos pretos)). Cada grupo experimental foi composto por 6 ratos selecionados aleatoriamente. Após avaliação nociceptiva, os animais foram anestesiados, perfundidos (PBS ou PFA 4%), eutanasiados e foram excisados os seguintes tecidos: maxilas, gengiva, gânglio trigeminal e subnúcleo caudal para as análises laboratoriais representadas na figura.

### Indução da Periodontite

A periodontite (PE) foi induzida como descrito por Bezerra et al. (2000). Os animais foram anestesiados com ketamina e xilazina (90:10 mg/kg, i.p.), e um fio de sutura de nylon 3.0 esterilizado (Nylpoint, Ceará, Brasil) foi colocado em torno do segundo molar superior esquerdo. Para permitir a passagem do fio, foi utilizada um guia através dos espaços interproximais (mesial e distal) do 2º molar superior esquerdo do animal. Após esse momento, o fio foi posicionado, de forma que o nó cirúrgico ficou voltado para a face vestibular (ALEXANDRE et al., 2018; BEZERRA et al., 2000; DE LIMA et al., 2000; GOES et al., 2010; SOUSA et al., 2016).

### **Teste de hipernociceção mecânica pelo teste de Von Frey**

O limiar de nociceção mecânica do animal foi avaliado na pele da maxila, na altura do 2º molar superior esquerdo, em um grupo normal e em um grupo PE, através do comportamento de retirada da cabeça do animal (*head-withdrawal threshold*) em resposta à aplicação de uma força (g) obtida através do registro da intensidade de força aplicada perpendicularmente na maxila na região do segundo molar superior esquerdo. No presente estudo, foi utilizado um equipamento desenvolvido pela Insight (Ribeirão Preto, SP, Brasil), o qual é baseado em um sistema de transdução digital que registra a força máxima aplicada ao animal até o momento de sua resposta de retirada da cabeça (DENADAI-SOUZA et al., 2009). Os animais foram submetidos à sessões de condicionamento ao teste de hipernociceção mecânica durante os 7 dias que antecederam a realização da PE. Além disso, diariamente antes da execução da avaliação da hipernociceção mecânica, os animais foram mantidos durante 30 minutos em gaiolas individuais para ambientação. Um observador cego foi treinado para a aplicação gradual de pressão na região do segundo molar superior esquerdo do animal. Os testes foram realizados no dia 0 antes da indução da PE e entre os dias 1 ao 21, diariamente, após a indução da PE. A hipernociceção mecânica foi registrada através da observação do limiar mecânico de retirada da cabeça resultante da média de três medidas consecutivas (CHAVES et al., 2011; DENADAI-SOUZA et al., 2009).

### **Teste do comportamento hipernociceptivo por formalina**

Para a avaliação do comportamento nociceptivo, os animais foram submetidos à indução da periodontite. A avaliação ocorreu nos dias 1, 3, 5, 7, 11, 14 e 21 após a indução da PE. Foi aplicado salina 0,9% (50 µL) ou formalina 0,5% (50 µL) através de uma injeção subcutânea no lábio superior esquerdo do animal. Grupos normal e 11 dias com PE sob administração de salina, foram utilizados como controle. Os demais grupos com PE receberam formalina. O procedimento ocorreu entre 6:00 e 16:00 h em uma sala silenciosa mantida a  $23 \pm 2$  °C. Os ratos foram colocados individualmente por 10 minutos em uma câmara de madeira espelhada (30 x 30 x 30 cm) com vidro na parte frontal para minimizar o estresse. Após anestesia com isoflurano (3%, 30s), cada animal recebeu uma injeção no lábio. A aplicação foi realizada com uma agulha de calibre 30 G conectada a uma seringa de Hamilton de 50 µL. Após os ratos recuperarem a consciência, aproximadamente 30s, voltaram à câmara de teste para um período de observação de 45 minutos (CLAVELOU et al., 1995). Um examinador treinado e cego avaliou as respostas nociceptivas através do número total acumulado em segundos em que

o animal esfregou a região orofacial com a pata dianteira ou traseira. O teste do estudo foi do tipo duplo-cego em que a pessoa que injetou as soluções não foi a mesma pessoa que avaliou as respostas comportamentais (CLAVELOU et al., 1995).

### **Coleta de materiais biológicos**

Imediatamente após as análises comportamentais por formalina, os animais foram anestesiados e submetidos à perfusão por PBS (salina tamponada) em temperatura ambiente por 1 minuto, quando a hemiarcada, o tecido gengival, o gânglio trigeminal e o subnúcleo caudal foram utilizadas para a realização da análise da perda óssea alveolar (POA), dosagem por ELISA, PCR e *Western Blotting*. Para as amostras biológicas destinadas à imunohistoquímica, os animais foram perfundidos com PBS seguido de PFA (paraformaldeído 4%) gelado por 7 minutos (Figura 1). As amostras foram armazenadas em freezer -80° C quando se destinaram à realização de Dosagem por ELISA ou *Western Blotting*; em formol tamponado a 10% quando se destinaram à realização de imunohistoquímica; ou em solução de TRIzol quando destinados à PCR com posterior congelamento a -80° C (ENGVALL; PERLMANN, 1971; TOWBIN; STAEHELIN; GORDON, 1979; BURNETTE, 1981; BEZERRA et al., 2000; PAXINOS; WATSON, 2007; ALEXANDRE et al., 2018; CHAVES et al., 2018).

### **Análise de Perda Óssea Alveolar**

Após 1, 3, 5, 7, 11, 14 e 21 dias após a indução da PE, as maxilas foram removidas e fixadas em formalina tamponada 10% durante 24 horas. Um grupo normal foi utilizado como controle. Ambas as hemimaxilas superiores foram então dissecadas e coradas com azul de metileno (1%) para diferenciar a região óssea da região dos dentes. A seguir foram fixados em um pedaço de cera com seus planos oclusais paralelos ao solo e os longos eixos dos dentes perpendiculares à câmera, e fotografados com uma câmera digital. As imagens foram lançadas em um software Image J® para a quantificação da perda óssea alveolar (POA). A POA, ou seja, a área de superfície exposta da raiz do molar (milímetros quadrados) na face vestibular do lado esquerdo da maxila, foi obtida subtraindo a área total maxila esquerda, incluindo a área do dente e de reabsorção óssea, pela área da maxila direita incluindo a região dos dentes (controle que não recebeu ligadura). Todas as imagens obtidas foram comparadas com uma área previamente

conhecida (1,0 x 1,0 mm<sup>2</sup>) (BEZERRA et al., 2000; DE LIMA et al., 2000; GOES et al., 2010; ALEXANDRE et al., 2018).

### **Dosagem por ELISA**

Amostras dos tecidos gengivais, gânglio trigeminal e subnúcleo caudal dos animais dos grupos normal e 11 dias com PE foram homogeneizadas com tampão RIPA (Santa Cruz Biotechnology). Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas (10.000 RPM/ 10 min / 4° C), e o sobrenadante utilizado para dosar os níveis TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8 e PGE<sub>2</sub> no tecido gengival e, para avaliação dos níveis de GLU, CGRP e SP, foram utilizados gengiva, gânglio trigeminal e subnúcleo caudal.

### **Dosagem de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8 e PGE<sub>2</sub>**

A detecção das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-8 e do prostanoide PGE<sub>2</sub> foi realizada por ELISA, usando o Kit DuoSet (R&D Systems). Brevemente, placas para ELISA de 96 poços foram incubadas por 14 horas a 4° C com 100  $\mu$ L por poço de anticorpo de captura para TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8 e PGE<sub>2</sub>. Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com 300  $\mu$ L de tampão de lavagem e bloqueadas com 100  $\mu$ L por poço com reagente diluente (R&D Systems). Após bloqueio das placas por 1 hora, 50  $\mu$ L das amostras e da curva padrão foram adicionadas a cada poço em várias diluições e incubadas por 2 horas a 4° C. As placas foram então lavadas três vezes com 300  $\mu$ L de tampão de lavagem e depois incubadas com anticorpo de detecção para TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8 e PGE<sub>2</sub>. Após o período de incubação a 4° C por 2 horas, as placas foram lavadas novamente por três vezes com 300  $\mu$ L de tampão de lavagem e incubadas a temperatura ambiente por 20 minutos com 100  $\mu$ L de estreptavidina diluída 1:200. Uma nova lavagem foi realizada por três vezes com 300  $\mu$ L de tampão de lavagem e 100  $\mu$ L da solução substrato para revelação (Kit DuoSet, R&D Systems) foi adicionado. As placas foram incubadas durante 20 minutos, no escuro, à temperatura ambiente. A reação enzimática foi parada com a solução de parada (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), e a absorbância medida a 450 nm. Os resultados foram obtidos em pg/mL.

## Glutamato e CGRP

Esses ensaios foram baseados no ELISA sanduíche. No qual, anticorpo anti-glutamato e anti-CGRP foram pré-revestidos nas placas correspondentes (Kit FineTest). Brevemente, as amostras previamente diluídas (1:2 Tampão de diluição) foram inseridas nos poços. A curva-padrão foi realizada em várias diluições e, juntamente com o branco, foram realizadas em duplicata. Após o preenchimento das placas, foi realizado o selamento com papel filme e foram incubadas a 37° C por 90 min. As placas foram lavadas com tampão de lavagem por duas vezes. Em seguida foi adicionada Biotina (anticorpo de detecção), e as placas incubadas a 37° C durante 1 hora. Após esse bloqueio, as placas foram novamente lavadas, adicionada solução de trabalho (HRP – Estraptavidina Conjugada) e incubadas a 37° C por 30 minutos. Nova lavagem das placas foi realizada por 5 vezes. Foi, então, adicionado Substrato TMB em cada um dos poços e realizada incubação a 37° C, no escuro, por 15-30 min. Finalmente foi adicionado solução de parada. A leituras foram prosseguidas imediatamente em absorvância de 450 nm. Os dados foram expressos em pg/mL.

## Substância P

Esse ensaio é baseado na competição entre Substância P e Substância P Acetilcolinesterase (AChE) conjugada (SP AChE *tracer*) (Kit Cayman). Resumidamente, a obtenção da concentração de SP nos tecidos é realizada de maneira indireta, partindo do conhecimento de que a SP livre é inversamente proporcional à SP *tracer* ligada em cada poço. A placa de 96 poços pré-revestidos com anticorpo (IgG monoclonal de camundongo e anti-coelho) foram incubadas *overnight* com as amostras, SP AChE *tracer* e anti-soro da SP, em temperatura de 4° C. As amostras foram previamente diluídas em 1:2 com tampão de diluição. A curva-padrão foi realizada em 8 diluições conforme solicitado no protocolo do fabricante. No dia seguinte, as placas foram lavadas por 5 vezes com tampão de lavagem para remover qualquer reagente não ligado. Em seguida os poços foram incubados com o reagente de Ellman's no escuro. A placa foi coberta com plástico filme e agitada por 90-120 min. O reagente de Ellman's contém SP AChE promovendo uma reação enzimática amarela. A intensidade de cor é proporcional à quantidade de SP *tracer* ligada ao poço e inversamente proporcional à quantidade de SP livre. Após esse bloqueio, a placa foi higienizada no fundo, destampada cuidadosamente e prosseguiu-se com a leitura da placa com comprimento de 412 nm. Os dados foram expressos em pg/mL.

### **Análise imuno-histoquímica para o receptor TRPV1**

A imuno-histoquímica para os receptores TRPV1 foi realizada no gânglio trigeminal dos grupos normal e PE aos 11 dias. Utilizou-se o método de estreptavidina-biotina-peroxidase (HSU; RAINE, 1981). Amostras de GT foram fixadas em formol tamponado a 10% durante 24 horas. Posteriormente, as amostras foram submetidas à rotina histopatológica para inclusão em parafina. Após este procedimento, foram realizados cortes seriados de 4 µm em micrótomo apropriado e colocados em lâminas de L-polilisina, apropriadas para a realização de imuno-histoquímica. Os cortes foram desparafinizados, hidratados em xilol e álcool e imersos em tampão citrato DAKO (pH 6,0), sob aquecimento em banho PT-LINK (DAKO), por 30 minutos para a recuperação antigênica a 95° C. Após o resfriamento, foram feitas lavagens com solução tamponada de fosfato (*Wash buffer*), intercaladas como bloqueio peroxidase endógena com solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> DAKO (20 minutos). Em seguida foi feito bloqueio de proteína (*protein in block*) por 20 minutos. Os cortes foram incubados por 1 h com anticorpo primário de cabra anti-VR1(Abcam), diluído 1:400. Após a lavagem em PBS, foi feita incubação com anticorpo secundário (de detecção) invision HRP (DAKO) por 30 min. Após nova lavagem com PBS, seguiu-se com coloração com cromógeno 3,3'diaminobenzidine-peróxido (DAB), seguida por contra-coloração com hematoxilina de Mayer. Por fim, foi realizada a desidratação das amostras e montagem das lâminas. O controle negativo foi processado simultaneamente como descrito acima, sendo o anticorpo primário substituído por PBS-BSA 5%.

As imagens foram capturadas por meio de um microscópio de luz acoplado a uma câmera com sistema de aquisição LAZ 3,5 (Leica DM 1000, Alemanha). Foram fotografados de 6 a 10 campos por corte histológico no aumento de 400x, e realizada a contagem de células positivas marcadas por cada campo utilizando o Adobe Photoshop CC. Foram consideradas as células positivas marcadas com coloração marrom citoplasmática e/ ou nuclear.

### **Quantificação por qRT-PCR da expressão dos genes dos receptores opioides µ e κ**

O RNA total foi extraído de tecidos gengival e do gânglio trigeminal dos grupos normal, 7, 11 e 14 dias de PE usando o reagente TRIzol (Invitrogen, São Paulo). A concentração de RNA foi estimada pela leitura da absorbância a 260 nm, e foi verificada a pureza a 280 nm em um espectrofotômetro (Amersham, Biosciences, Cambridge, Inglaterra). Para cada amostra, as concentrações de RNA utilizadas para sintetizar o cDNA foram ajustados para 10 ng/µL. Antes da reação de transcrição reversa, as amostras de RNA foram incubadas

durante 5 min a 70° C e depois resfriadas em gelo. De acordo com as instruções do fabricante (Invitrogen, São Paulo), foi preparada uma reação inicial de 14 µL contendo: 1 µL de Oligo d(T) (50 µM), 1 µL do mix de dNTP (10 mM), 1 µL de RNA, 10 µL de água livre de RNase. A mistura foi aquecida a 65°C por 5 min e resfriada em gelo por 1 min. Em seguida, foram adicionados à mistura 4 µL de tampão da enzima (5x SSIV), 1 µL de DTT (100 mM), 1 µL de inibidor de ribonuclease (40 U/µL) e 1 µL da enzima SuperScript™ IV Reverse Transcriptase. A mistura foi incubada a 50°C por 10 min, em seguida a 80°C por 10 min e finalmente armazenada a -20°C.

A reação PCR em tempo real (qRT-PCR) foi realizada em triplicata para determinar os níveis do RNAm para receptores opioide: *mu opioid* e *kappa 1 (Oprk1)*. Cada reação continha 10 µL de SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido), 7,3 µL de água ultrapura, 1 µL de cDNA e 0,5 µM de cada primer e foi realizado no termociclador StepOne Real-Time PCR (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido). Os ciclos de qRT-PCR consistiram em uma desnaturação inicial e a ativação da enzima polimerase durante 10 minutos a 95° C, seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95° C, 30 segundos a 58° C e 30 segundos a 72° C. A extensão final foi de 10 minutos a 72° C. Os primers foram desenhados utilizando a ferramenta PrimerQuest® <https://www.idtdna.com/Primerquest/Home/Index>. A sequência dos primers utilizados neste estudo é mostrada na Tabela 1. A enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foi utilizada como controle endógeno para a normalização da expressão de RNAm. A especificidade de cada par de primers foi confirmada pela análise da curva de melting dos produtos da qRT-PCR. As quantificações relativas do RNAm foram realizadas utilizando os valores de Ct (Cycle threshold) – Ct utilizados para as análises foram a média aritmética entre as triplicatas dos genes alvo e controles endógenos. O método  $\Delta\Delta Ct$  foi usado para transformar os valores de Ct em níveis de expressão relativa normalizados (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Tabela 1 - Pares de iniciadores utilizados em números de acesso de PCR e NCBI em tempo real.

Gene alvo	Sequência do primer (5' → 3')	Sense (S), anti-sense (As)	Nº acesso GeneBank
<i>GAPDH</i>	GGACCAGGTTGTCTCCTGTG	S	NM_017008.4
	CATTGAGAGCAATGCCAGCC	As	
<i>Mu opioid</i>	CCCCCATCCACATCTACGTC	S	L13069.1
	AGAAGTGCCAGGAAACGGTC	As	
<i>Kappa 1 (Oprk1);</i>	CTGCATTTGGCTACTGGCATC	S	NM_017167.3
	TGACATCCACATCTTCCCTGAC	As	

### Eletrforese e Western Blotting para avaliação da expressão dos receptores opioides $\mu$ e $\kappa$

Amostras do gânglio trigeminal dos grupos normal e 11 dias de PE foram homogeneizadas com tampão RIPA (Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, EUA) com os inibidores de proteases (Sigma-aldrich, Darmstadt, Alemanha). Uma alíquota do homogeneizado foi separada para dosagem de proteínas. Em seguida as proteínas foram separadas por eletrforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 10% e transferidas para membranas de nitrocelulose. As membranas foram bloqueadas em TBS (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, e 0,1% de Tween 20, pH 7,53) contendo 5% de leite seco sem gordura durante a noite em 4° C, depois foi inserido TBS. As membranas foram devidamente tratadas com anticorpos (Ac) apropriados em temperatura ambiente: receptor  $\mu$ -opioide (MOR) (Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, EUA) ou receptor  $\kappa$ -opioide (KOR) (Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, EUA). As membranas foram novamente incubadas utilizando um Ac secundário conjugado com peroxidase (1:5000) diluído em TBST contendo 5% de leite seco sem gordura em temperatura ambiente durante 1 h. Finalmente, as bandas reconhecidas pelo Ac específico foram visualizadas usando um sistema ECL baseado em quimioluminescência (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) e expostas a um filme de raios-X durante 30 min. (Eastman Kodak, Rochester, NY). Um sistema de imagem baseado em computador (National Institutes of Health, Bethesda, MD) foi usado para medir a densitometria das bandas (LI et al., 2002; BURNETTE WN et al., 1981; TOWBIN H et al., 1979).

## **Análise estatística**

Os resultados foram apresentados como médias  $\pm$  EPM para dados paramétricos. Todos os testes foram realizados usando o programa SPSS 23.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA) para o Windows. Todos os gráficos foram feitos com o software GraphPad Prism 6 (software GraphPad Prism, La Jolla, CA, EUA) para Windows. Nível de Probabilidade ( $p < 0,05$ ) foi considerado.

As análises da expressão dos genes foram realizadas através do método de Livak e Schmittgen (2001). Para a realização das análises quantitativas, os valores de Cycle threshold (Ct) obtidos para cada gene de cada animal foram normalizados com o nível de expressão de GAPDH para o estudo da expressão das moléculas de RNAm dos receptores para *mu opioide e kappa 1 (Oprk1)* durante a evolução da PE. O nível de expressão relativa foi obtido pelo cálculo do  $\Delta Ct = m\Delta Ct_a$  (Média variação de Ct do grupo experimental alvo) –  $m\Delta Ct_b$  (Média da variação de Ct do grupo experimental controle). A quantificação relativa foi obtida pelo método E (eficiência do primer)<sup>- $\Delta\Delta Ct$</sup>  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001; PFAFFL, 2001). A especificidade das reações foi confirmada pela melting curve.

A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Os *outliers* foram removidos. O teste T de Student ou ANOVA unidirecional foi realizado. A homogeneidade das variâncias para todas as variáveis foi testada pelo teste de Levene para definir o teste post-hoc Tukey ou Games-Howell para analisar associações entre as variáveis.

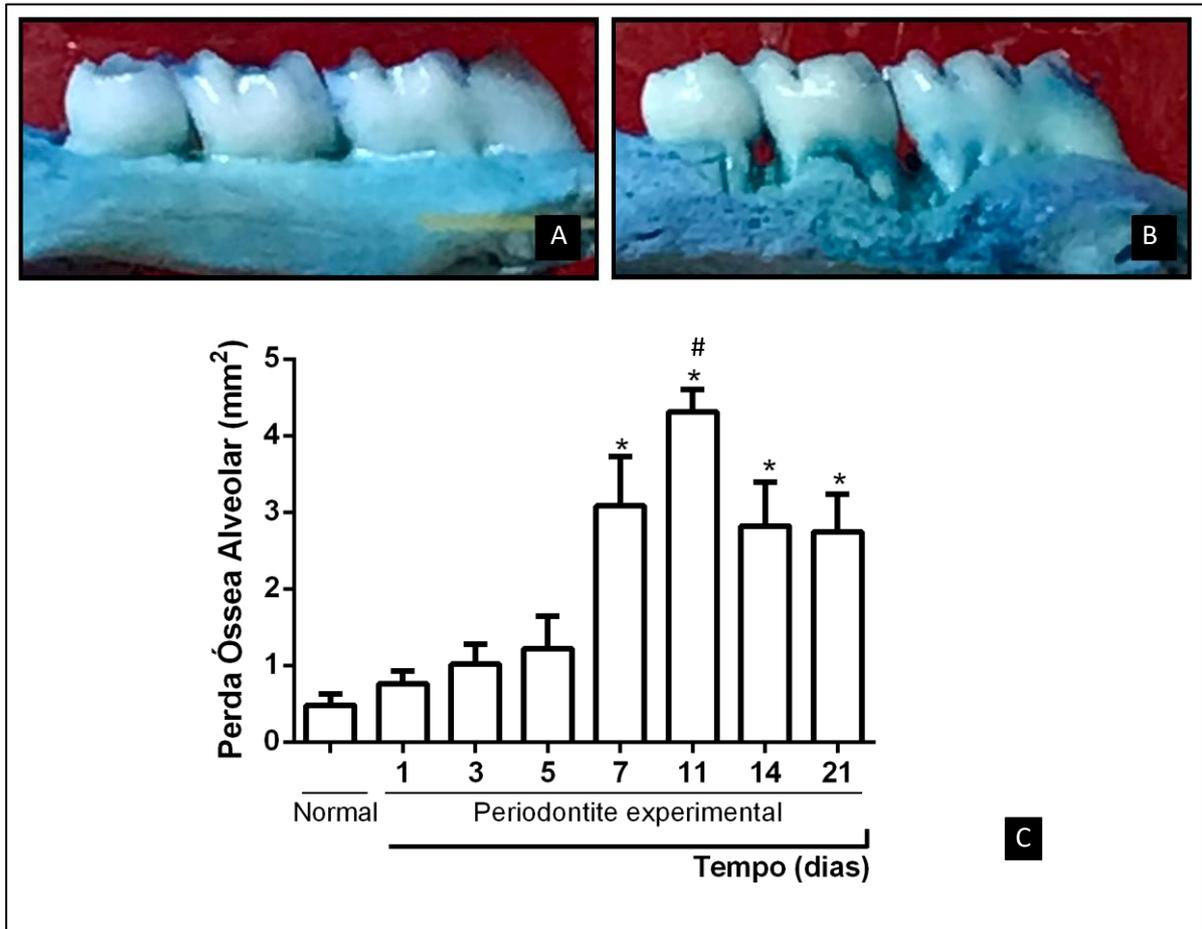
## **RESULTADOS**

### **Perda óssea alveolar**

Após a indução da periodontite nos dias 1, 3, 5, 7, 11, 14 e 21, através da colocação de um fio de náilon em torno dos segundos molares superiores esquerdos, observou-se, no exame macroscópico das hemimaxilas, uma reabsorção óssea alveolar significativa nos grupos 7º dia ( $3,49 \text{ mm}^2 \pm 0,6$ ), 11º dia ( $4,3 \text{ mm}^2 \pm 0,23$ ), 14º dia ( $3,31 \text{ mm}^2 \pm 0,5$ ) e 21º dia ( $2,98 \text{ mm}^2 \pm 0,47$ ) em relação ao grupo normal ( $0,37 \text{ mm}^2 \pm 0,1$ ;  $p < 0,00001$ ), e do grupo 11º dia em relação aos demais grupos de PE ( $p < 0,001$ ). Os grupos com PE nos dias 7, 14 e 21 não apresentaram diferenças estatísticas entre si. A perda óssea alveolar foi progressiva e observada a partir do primeiro dia da indução da periodontite, atingindo aumento significativo da reabsorção no 7º dia

e um pico máximo de cerca de 4 mm<sup>2</sup> no 11º dia (Figura 2 - A e B). Após isso, a POA sofreu um pequeno declínio no 14º e no 21º dia (Figura 2 - C).

Figura 2 - Análise macroscópica da Perda Óssea Alveolar em ratos.

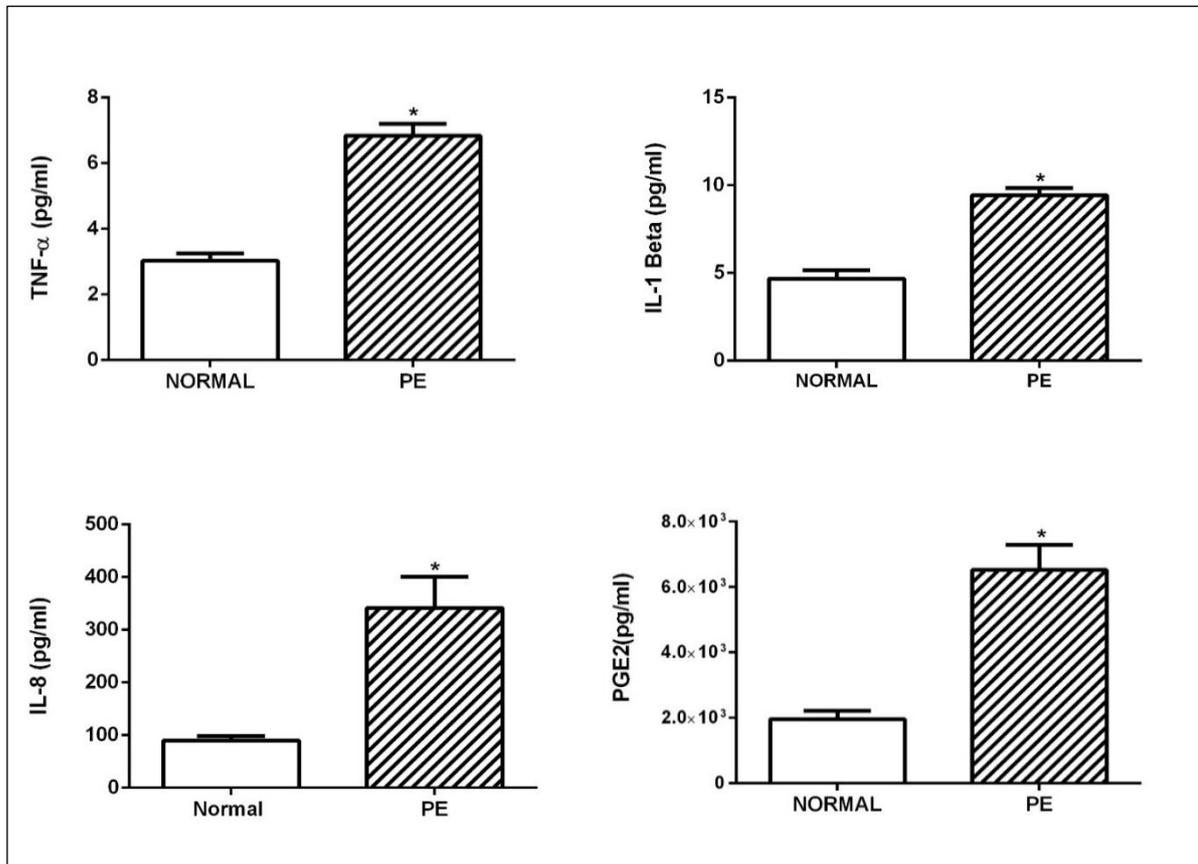


A periodontite experimental induzida por colocação de um fio de náilon em torno da cervical dos segundos molares superiores esquerdos causou perda óssea alveolar: A) Aspectos macroscópico da hemimaxila normal; B) Aspecto macroscópico da hemimaxila com 11 dias da PE (A e B - ampliação de 4x); C) Perda óssea alveolar significativa nos dias 7, 11, 14 e 21 dias. \* $p < 0,00001$  foi considerado significativamente diferente comparado ao normal. # $p < 0,001$  foi considerado significativamente diferente quando comparado aos outros grupos 1, 3, 5, 7, 14 e 21 dias de PE. Os dados foram expressos como média  $\pm$  EPM (ANOVA, Games-Howell).

### Análise dos níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8 e PGE<sub>2</sub> em ratos com periodontite

No 11º dia, a indução da periodontite foi associada à níveis aumentados de TNF- $\alpha$  (6,83 pg/mL  $\pm$ 0,8), IL-1 $\beta$  (8,97 pg/mL  $\pm$ 1,7) e IL-8/CINC-1 (376,5 pg/mL  $\pm$ 129,3), quando comparado aos respectivos grupos normais (3,03 pg/mL  $\pm$ 0,4;  $p < 0,00005$ ; 4,51 pg/mL  $\pm$ 1,15;  $p < 0,01$ ; 101 pg/mL  $\pm$ 35,1;  $p < 0,0002$ ) (Figura 3). Além disso, foram encontrados níveis maiores de PGE<sub>2</sub> (6522,0 pg/mL  $\pm$ 1539,5) significativamente nos tecidos gengivais de ratos com 11 dias de PE, também em comparação ao grupo normal (1965,35 pg/mL  $\pm$ 672,2;  $p < 0,00006$ ) (Figura 3Figura ).

Figura 3 - Análise dos níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8 e PGE<sub>2</sub> no tecido gengival de ratos.

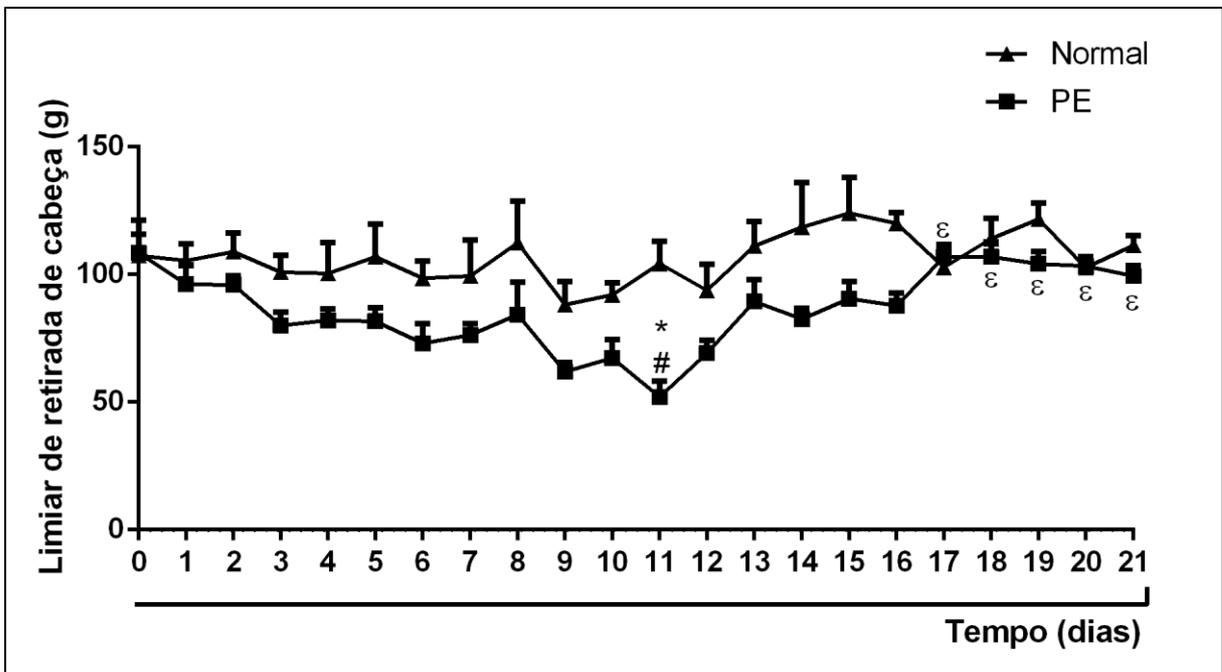


Os níveis teciduais das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8 e do prostanóide PGE<sub>2</sub> aumentaram significativamente no 11º dia de PE em relação ao grupo normal. \* $p < 0,01$  indica a diferença estatística entre os grupos PE em relação ao normal. Os dados foram expressos como média  $\pm$  EPM (Teste t de Student).

### Avaliação de hipernociceção mecânica pelo teste do Von Frey em ratos com periodontite

A avaliação da hipernociceção mecânica na região da pele correspondente ao segundo molar superior esquerdo foi realizada no dia 0 (antes da indução da periodontite) e diariamente dos dias 1 ao 21 após a indução da PE. Observou-se que apenas o 11º dia com PE na cinética temporal ( $52,09 \text{ g} \pm 6,24$ ;  $p < 0,0019$ ) apresentou redução significativa do limiar de retirada de cabeça em relação ao dia 0 ( $107,42 \text{ g} \pm 13,7$ ), sendo também diferente do 11º dia do grupo normal ( $114,37 \text{ g} \pm 8,6$ ;  $p < 0,02$ ). A partir do 13º dia, houve aumento significativo do limiar de retirada da cabeça no grupo PE ( $106,76 \text{ g} \pm 3,5$ ;  $p < 0,0001$ ) em comparação ao 11º dia de PE (Figura 4).

Figura 4 - Cinética da hipernociceção mecânica em ratos submetidos à PE.

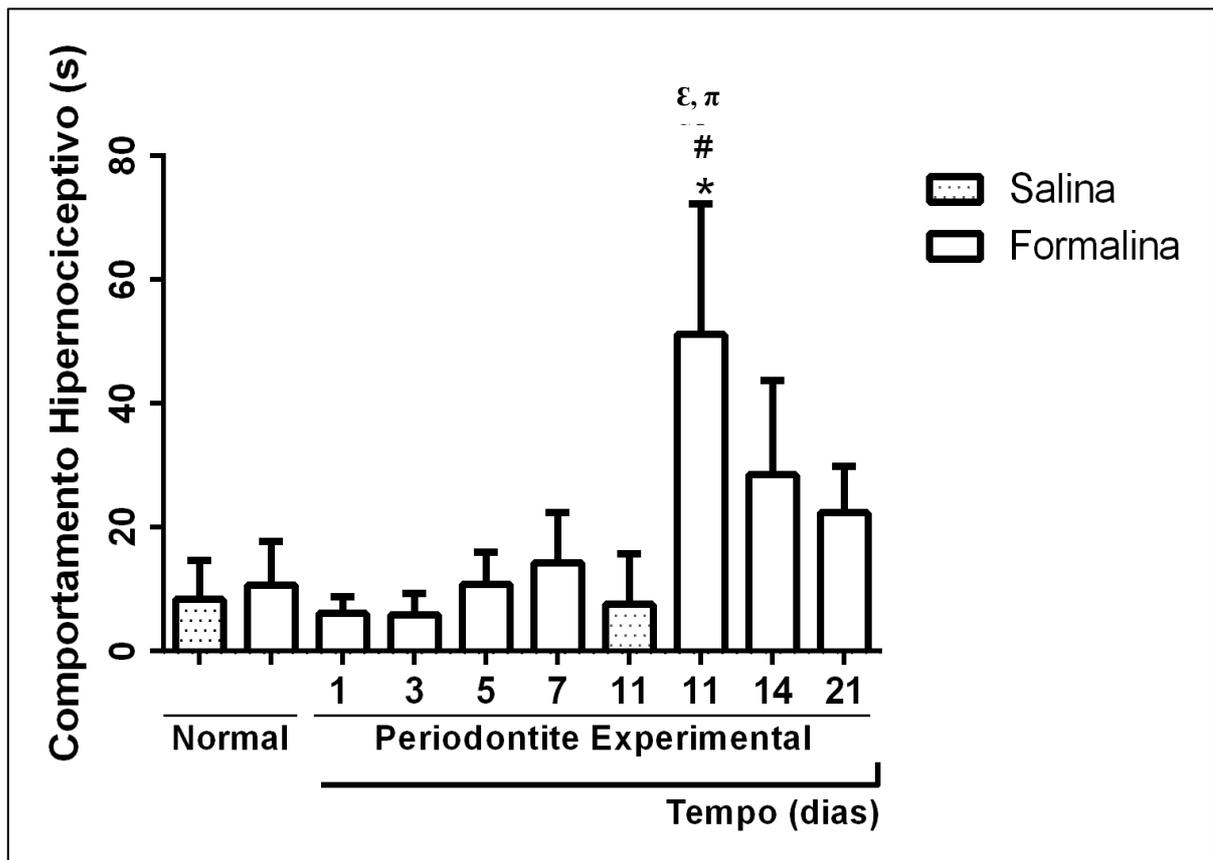


A periodontite experimental reduziu o limiar nociceptivo no 11º dia, significativamente em relação aos demais dias e grupos. Os dados representam a média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,02$  indica a diferença estatística em relação ao dia basal (0). # $p < 0,02$  indica diferença estatística em relação entre o 11º dia normal.  $\epsilon$   $p < 0,02$  indica diferença estatística em relação ao 11º dia com PE. Os dados foram expressos como média  $\pm$  EPM (ANOVA, Tukey).

### Análise do comportamento nociceptivo orofacial desencadeado pela injeção de formalina em ratos com periodontite

Com a administração de formalina no lábio superior esquerdo (0,5%; 50  $\mu$ l, s.c.), observou-se aumento significativo do comportamento nociceptivo no grupo 11 dias de PE (42,0 $\pm$ 5,78;  $p < 0,05$ ) em comparação a todos os demais grupos com periodontite experimental que receberam formalina subcutânea, assim como quando comparado aos grupos normais que receberam salina (8,38  $\pm$  1,48;  $p < 0,0008$ ) ou formalina (18,41  $\pm$  3,67;  $p < 0,05$ ), e ao grupo 11 dias de PE que recebeu salina (5,12  $\pm$  1,35s;  $p < 0,0003$ ). Após o aumento no 11º dia, houve redução significativa a partir do 14º dia. Salienta-se que não houve diferença estatística entre os grupos normais entre si e entre o grupo PE que recebeu salina (Figura 5).

Figura 5 - Comportamento nociceptivo na periodontite em ratos.

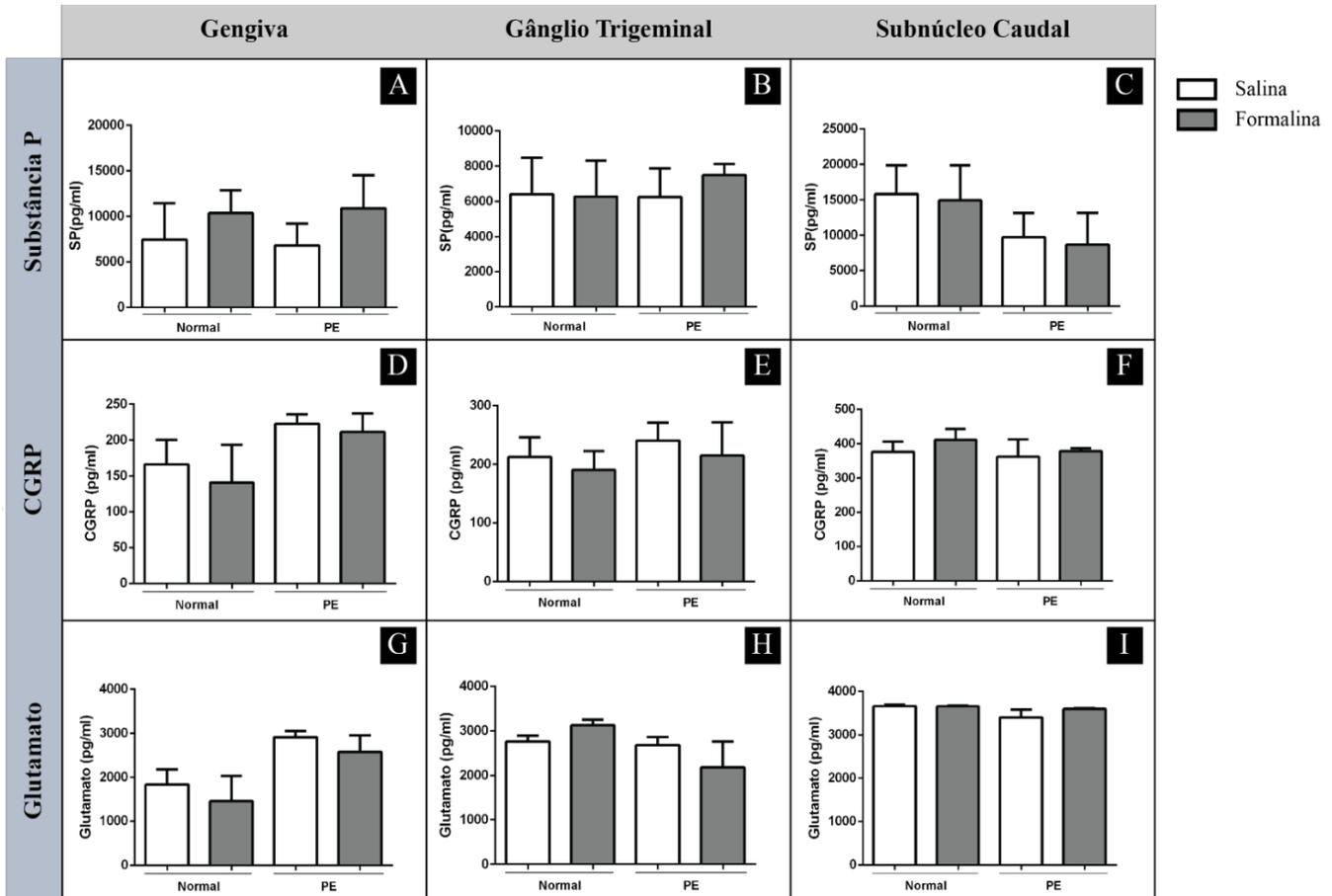


A resposta comportamental nociceptiva induzida pela injeção de formalina (0,5%) (s.c), foi significante maior em ratos submetidos à PE nos grupos 11 dias. \* $p < 0,05$  indica a diferença estatística entre os grupos PE em relação ao normal (salina). # $p < 0,05$  indica diferença estatística entre grupo controle formalina.  $\epsilon$   $p < 0,05$  indica diferença entre os demais grupos PE.  $\pi p < 0,05$  indica diferença estatística entres o grupo 11 dias normal (salina). Os dados foram expressos como média  $\pm$  EPM (ANOVA, Games-Howell).

### Análise do dos níveis de SP, CGRP e GLu em ratos com periodontite experimental.

Níveis médios dos neuropeptídios SP e CGRP e do aminoácido GLu foram avaliados na gengiva (Figura 6 - A, D e G), no gânglio trigeminal (Figura 6 - B, E e H) e no subnúcleo caudal (Figura 6 - C, F e I) em animais após 11 dias da indução da PE que receberam salina ou formalina (s.c) no lábio superior, bem como nos grupos normais que também receberam salina ou formalina. Após dosagem por ELISA constatamos que não houve diferenças estatísticas entre os grupos 11 dias de PE (formalina) e 11 dias PE (salina) entre si, tampouco com os grupos normais formalina e salina, em nenhum dos tecidos analisados.

Figura 6 - Análise dos níveis de SP, CGRP e GLu em ratos submetidos à periodontite.

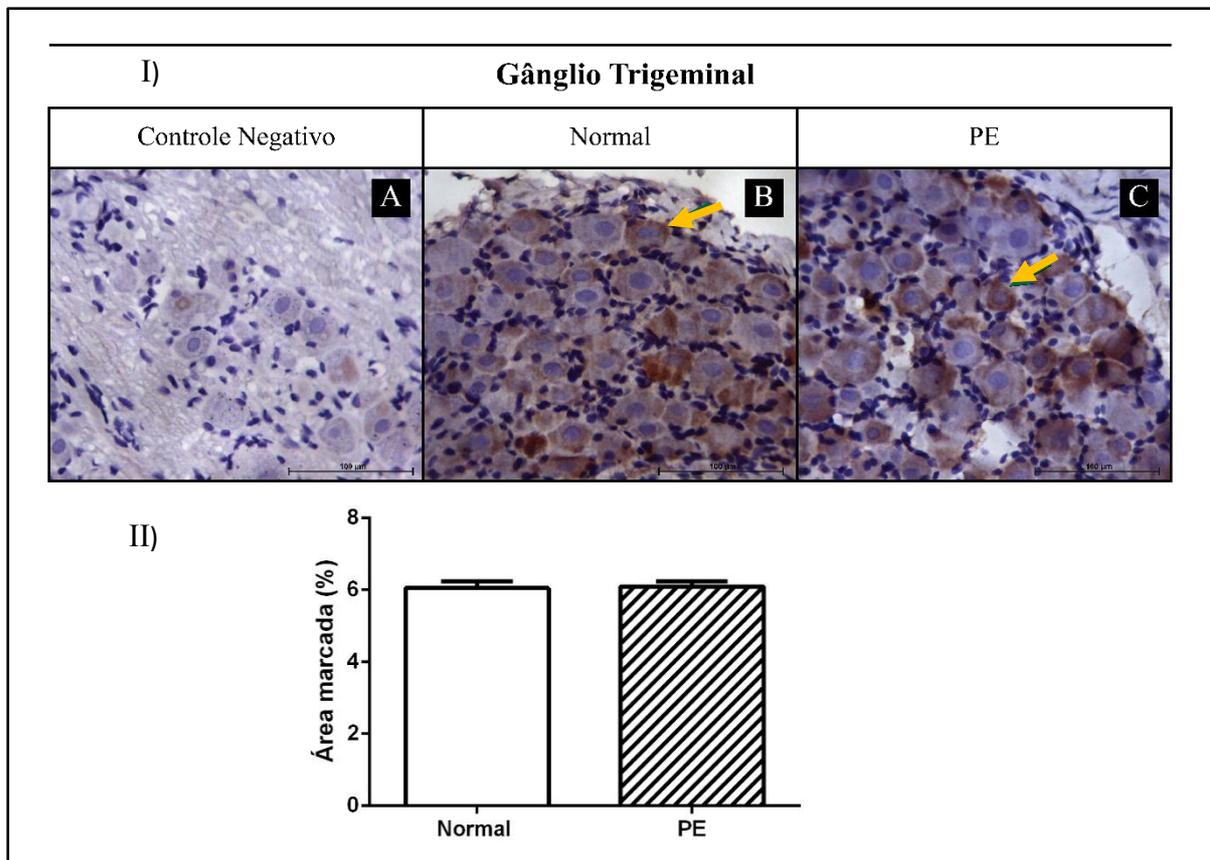


Em (A), (D), (G), os níveis de SP, CGRP e GLu na gengiva nos grupos 11º dia de PE e normal (formalina e salina). Em (B), (E), (H), os níveis de SP, CGRP e GLu no gânglio trigeminal. nos grupos 11º dias de PE e normal (formalina e salina). Em (C), (F), (I) Níveis de SP, CGRP e GLu no subnúcleo caudal no grupo 11º dias de PE e normal (formalina e salina). Nenhum dos grupos apresentou diferenças estatísticas. Os dados foram expressos como média  $\pm$  EPM (ANOVA, Games-Howell).

### Análise imuno-histoquímica para o receptor TRPV1 no gânglio trigeminal de ratos com periodontite

No 11º dia de indução da periodontite, a imuno-histoquímica do gânglio trigeminal apresentou imunomarcção positiva (marrom) para TRPV1 em neurônios (Figura 7 - I C) em 11 dias de PE, semelhante ao observado em animais do grupo normal (Figura 7 - I B). No controle negativo não houve imunomarcção (Figura 7 - I A). Observou-se também que não houve diferença estatística na expressão dos receptores TRPV1 no gânglio trigeminal ( $6,05 \% \pm 0,59$ ) em comparação ao grupo normal ( $6,09 \% \pm 0,33$ ) (Figura 7 - II).

Figura 7 - I) Fotomicrografia do gânglio trigeminal de ratos. II) Análise da expressão de TRPV1 no gânglio trigeminal de ratos submetidos à PE.

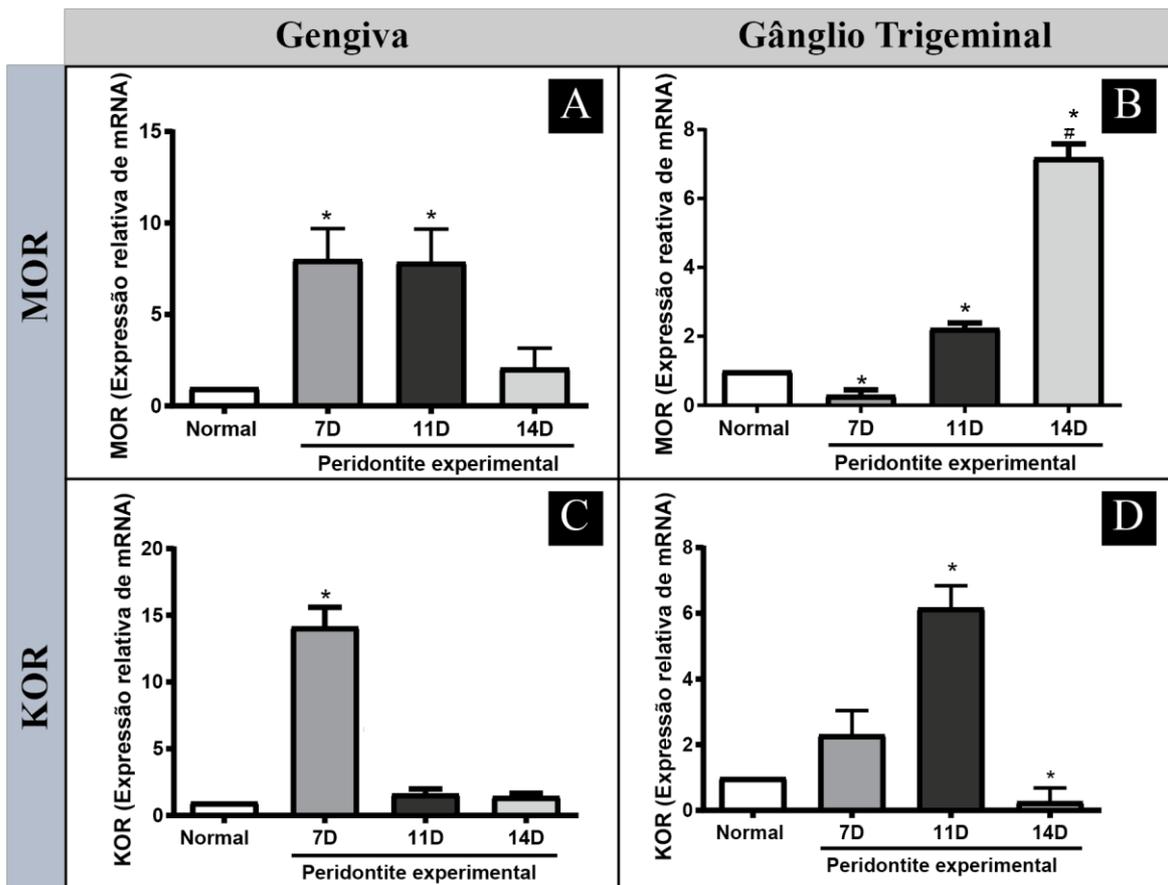


(I-A) Controle negativo, grupo no qual não foi induzida PE (400x). (I-B) Grupo normal (400x). (I-C) Grupo 11 dias de periodontite (400x). Seta amarela indica imunoexpressão marrom de TRPV1 nos neurônios do gânglio trigeminal. (II) A imunomarcção para TRPV1 no grupo PE 11 dias não apresentou diferença estatística em comparação ao grupo normal. Os dados foram expressos como média  $\pm$  EPM (Teste T de Student)

### Quantificação por qRT-PCR da expressão relativa mRNA dos receptores opioides $\mu$ (MOR) e $\kappa$ (KOR)

Na análise da expressão gênica dos receptores opioides na gengiva, observou-se um aumento significativo na expressão de MOR nos dias 7 ( $8,01 \pm 0,83$ ;  $p < 0,00004$ ) e 11 ( $7,85 \pm 0,9$ ;  $p < 0,0001$ ) de PE em relação ao normal ( $1,00 \pm 0,0$ ) (Figura 8A). A expressão do KOR no tecido gengival foi aumentada no 7º dia de PE ( $14,85 \pm 0,73$ ;  $p < 0,001$ ) em relação ao normal (Figura 8C). No gânglio trigeminal ocorreu um aumento do MOR no 11º ( $2,03 \pm 0,73$ ;  $p < 0,002$ ) e 14º dia de PE ( $7,19 \pm 0,17$ ;  $p < 0,0002$ ), em comparação ao normal (Figura 8B). Em relação à expressão gênica do receptor KOR no GT, observou-se um aumento no 11º ( $6,16 \pm 0,34$ ;  $p < 0,002$ ) em relação ao grupo normal ( $1,00 \pm 0,0$ ) (Figura 8D).

Figura 8 - Níveis da expressão relativa de RNAm para MOR e KOR na GE e no GT de animais submetidos à PE.

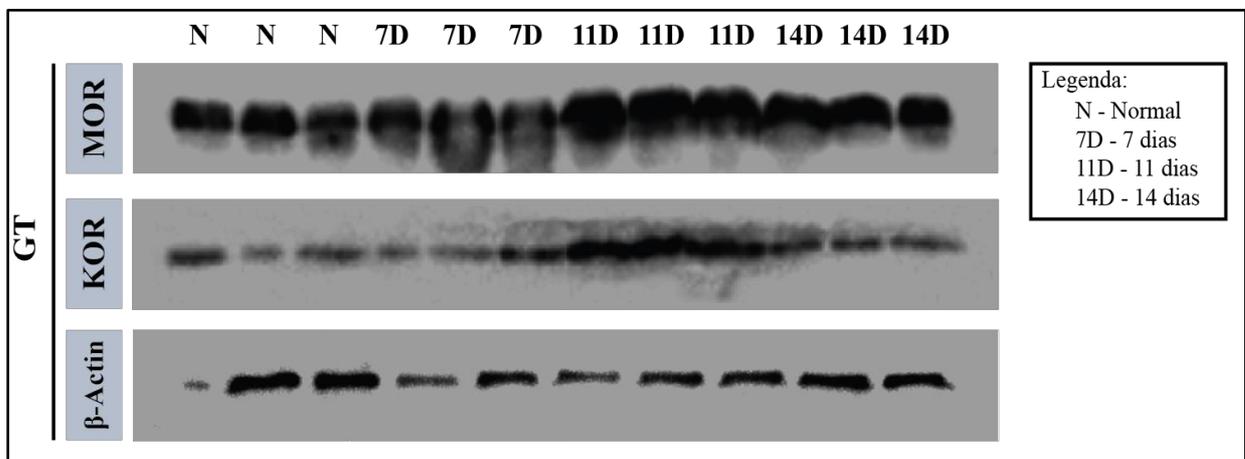


Análise da expressão relativa dos receptores opioides: (A) MOR na GE (ANOVA, Tukey); (B) MOR no GT (ANOVA, Tukey); (C) KOR na GE (ANOVA, Tukey); (D) KOR no GT (ANOVA, Games-Howell). Os dados foram expressos como média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  indica a diferença estatística em relação ao normal.

### Análise qualitativa por *Western Blotting* da expressão dos receptores $\mu$ (MOR) e $\kappa$ (KOR)

Na análise da expressão proteica de MOR no GT, ocorreu um aumento na densidade das bandas no 11° e 14° de PE em comparação ao grupo normal. O grupo 7 dias mostrou-se semelhante ao normal. Em relação à expressão qualitativa de KOR no gânglio trigeminal, foi possível observar um aumento da densidade das bandas no 11° dia de PE em relação ao grupo normal e manutenção da densidade nos dias 7 e 14 em relação ao normal. A proteína  $\beta$ -actina foi utilizada como controle (Figura 9).

Figura 9 - Níveis da expressão de MOR e KOR no GT de animais submetidos à PE.



Análise da expressão proteica dos receptores MOR e KOR no gânglio trigeminal nos dias 7, 11 e 14 dias da indução da PE e no grupo normal. Foi utilizada  $\beta$ -actina como controle.

## DISCUSSÃO

Nosso estudo de periodontite experimental induzida em ratos mostrou reabsorção óssea nos dias 7, 11, 14 e 21 dias, com pico de reabsorção no 11° dia de PE, e aumento das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8 e prostanglandina E<sub>2</sub> no tecido gengival. Pela análise com Von Frey elétrico, os ratos apresentaram redução do limiar de retirada de cabeça no 11° dia, com retorno ao normal no 17° dia de PE, e, através de análise comportamental pelo teste da formalina, houve aumento do comportamento nociceptivo também no 11° dia com PE. Os níveis de SP, GLu, CGRP e TRPV1 se mantiveram semelhantes entre os grupos PE e normal. Na GE ocorreu um aumento significativo na expressão gênica do MOR nos dias 7 e 11 da PE, e do KOR no 7° dia de PE. No GT, ocorreu um aumento da expressão gênica e das proteínas do receptor MOR nos dias 11° e 14° da PE, e do KOR no 11° dia da PE.

Neste estudo, utilizou-se um modelo bem estabelecido de perda óssea alveolar induzida por ligadura, no qual o fio de náilon atua como fator de retenção de biofilme bacteriano, induzindo resposta imunoinflamatória do hospedeiro levando à perda óssea alveolar (BEZERRA et al., 2000; DE LIMA et al., 2000; GOES et al., 2010; SOUSA et al., 2016; ALEXANDRE et al., 2018). Na análise macroscópica, a perda óssea alveolar foi observada a partir do 1º dia após a indução da periodontite, atingindo um máximo no 11º dia, e apresentando uma redução a partir do 14º dia, conforme padronizado por De Lima et al., em 2000. Importante salientar que, embora ocorra uma regressão do dano tecidual a partir do 14º dia, a lesão tissular é considerada irrecuperável, comprometendo a fisiologia do sistema estomatognático (DE LIMA et al. 2000).

Essas alterações celulares e teciduais podem ser explicadas por uma liberação local de mediadores inflamatórios. Nesse contexto, constatamos que a PE foi acompanhada de uma elevação dos níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , CINC-1/IL-8 e PGE<sub>2</sub> em tecido gengival no 11º dia de PE em comparação com os animais saudáveis, corroborando com outros estudos (GOES et al., 2012; ARAÚJO et al., 2013; GONÇALVES et al., 2014; TEIXEIRA et al., 2017; ALEXANDRE et al., 2018; RIBEIRO et al., 2018). Os agentes microbianos iniciam e estimulam uma resposta imunoinflamatória no hospedeiro durante a periodontite. As células imunes provenientes dessa resposta produzem continuamente mediadores inflamatórios, como as citocinas (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) e quimiocinas (IL-8) que iniciam e mantêm o processo inflamatório (TEIXEIRA *et al.*, 2017; RIBEIRO *et al.*, 2018). O aumento da biossíntese da PGE<sub>2</sub> no tecido gengival durante a periodontite ocorre devido à elevação dos níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , e esta síntese atua principalmente para aumentar a magnitude dessa resposta inflamatória, causando dano tecidual e perda óssea (OFFENBACHER; HEASMAN; COLLINS, 1993; TRINDADE et al., 2014; SÁNCHEZ et al., 2013; RIBEIRO et al., 2018).

Os níveis de citocinas e do prostanoide PGE<sub>2</sub> apresentam importância, também, na gênese da dor inflamatória (CUNHA et al., 2005; LOO et al., 2012; SÁNCHEZ et al., 2013). O disparo da cascata da citocinas, que inicia com a bradicinina e subsequente liberação de TNF- $\alpha$ , seguida por IL-6 e IL-1 $\beta$  e com a participação concomitante de IL-8 (CINC-1), é responsável pela estimulação dos principais mediadores primários: prostaglandinas e aminas simpáticas (CUNHA; FERREIRA, 2003; 2005; 2008). A PGE<sub>2</sub> é um mediador hipernociceptivo de ação direta nos nociceptores e está associada, também, ao aumento da resposta dolorosa da bradicinina promovendo uma sinergia hiperalgésica (OFFENBACHER; HEASMAN; COLLINS, 1993; CUNHA et al., 2008). Além de agir diretamente, as

prostaglandinas, em conjunto com as aminas simpáticas, ativam as vias de segundos mensageiros (AMPC, proteína quinase A e proteína quinase C) reduzindo o limiar do nociceptores e aumentando a excitabilidade da membrana neuronal produzindo um estado de facilitação da ativação e transmissão de impulsos pelos neurônios primários (FERREIRA; NAKAMURA, 1979; TAIWO; LEVINE, 1989; CUNHA; TEIXEIRA; FERREIRA, 1999; SOUZA et al., 2002).

Para compreender a resposta nociceptiva da PE, realizamos o teste da hipernocicepção mecânica. Avaliamos a resposta mecânica à nocicepção do 1º ao 21º dia após a indução da periodontite, a resposta nociceptiva aumentou ao 11º dia de PE coincidindo com o período em que a doença atinge um pico máximo na destruição do periodonto, e retornando aos valores de normalidade a partir do 17º dia de PE. Esses achados corroboram com os parâmetros inflamatórios apresentados em nosso estudo, com destruição dos tecidos periodontais e aumento dos mediadores inflamatórios, que sensibilizam nociceptores periféricos e causam hiperalgesia mecânica e comportamento nociceptivo quando induzido (ZHANG et al., 2011; ZHANG; BURSTEIN; LEVY, 2012).

Para essa avaliação de hipernocicepção mecânica, utilizamos um analgesímetro digital na região da pele correspondente ao 2º molar maxilar esquerdo, região onde foi induzida a PE. O Von Frey elétrico foi previamente testado e validado para as regiões da ATM em ratos (REN, 1999; CHAVES et al., 2011; 2018), no lábio (LIS et al., 2017), na região da pele da maxila (WATASE et al., 2018) e na gengiva em camundongos (SUZUKI et al., 2017). O teste de hipernocicepção mecânica é aplicado para avaliar nociceptores de fibras A $\delta$  e C. Le Bars; Gozariu; Cadden (2001 a; b) propuseram que, durante esse teste, os mecanorreceptores podem ser ativados, o que resulta em estímulos inespecíficos que nem sempre refletem a neurofisiologia da nocicepção. No entanto, estudos de Sessle et al. (1986; 2011) relataram que a hiperalgesia primária pode vir sequenciada da hiperalgesia secundária, o que promove um aumento do campo receptivo, e esses neurônios superficiais passam a ser envolvidos com a transmissão de informações relacionadas às estruturas profundas, bem como às superficiais. Diante do exposto, realizamos o presente estudo com a aplicação do Von Frey elétrico na pele da maxila esquerda, na região do segundo molar, que é bem representada pelas aferências cutâneas do animal. Dessa forma, a hipernocicepção analisada exhibe a resposta noceptiva real na região periodontal, embora seja aferida na pele (SESSLE et al., 1986; 2000; 2005; 2011). Corroborando com essas informações, Watase et al., em 2018, avaliaram um modelo de dor

inflamatória da polpa dentária em ratos também com aplicação de estímulos mecânicos na pele da maxila, na região do primeiro molar superior.

Para comprovar o teste de hipernocicepção mecânica, realizamos o teste do comportamento hipernociceptivo evocado por formalina no lábio superior esquerdo, modelo adaptado para a região orofacial por Clavelou et al., em 1989. Os modelos de hipernocicepção com estímulos químicos são consideradas as abordagens experimentais que mais se aproximam da dor clínica (LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001a). O uso da formalina na indução da nocicepção elicia um padrão bifásico de comportamentos relacionados à nocicepção: uma fase neurogênica precoce e de curta duração que age nos nociceptores de fibra C, seguida por uma segunda, a fase inflamatória mais sustentada, geralmente associada à liberação local de mediadores inflamatórios (CHICHORRO; LORENZETTI; ZAMPRONIO, 2004). Clavelou et al. (1995) e Chicorro et al. (2004) investigaram doses subliminares da formalina que provocam a primeira fase de resposta nociceptiva (fase neurogênica), mas que não foram capazes de sustentar a segunda fase (inflamatória) e obtiveram as concentrações de 0,5% e 0,63%, respectivamente. Nós escolhemos utilizar a dose subliminar 0,5% descrita por Clavelou et al., 1995, por ser a concentração mais baixa para avaliar a resposta nociceptiva, sem promover a liberação de mediadores inflamatórios, e, dessa maneira, conseguimos avaliar apenas a atividade nociceptiva oriunda da PE.

De fato, nossos resultados corroboraram com estudos de Clavelou et al. (1995), mostrando que a dose de 0,5% de formalina (s.c) não é capaz de iniciar por si só uma resposta nociceptiva, pois não apresentou comportamento nociceptivo aumentado em comparação ao grupo salina. Também, observou-se que a periodontite por si só não é capaz de induzir resposta nociceptiva, visto que a administração de salina no pico da perda óssea, aos 11 dias, não evocou resposta nociceptiva. Apenas o grupo 11 dias PE que recebeu a dose subliminar de formalina 0,5% apresentou resposta comportamental nociceptiva, corroborando com os achados da hipernocicepção mecânica, e comprovando a presença de sensibilização periférica (GRIESBACHER; SUTLIFF; LEMBECK, 1994; GAURILCIKAITE; RENTON; GRANT, 2017) A ideia proposta é que a PE não seja capaz de produzir sozinha a hipernocicepção (ABD EL-ALEEM; MORALES-AZA; DONALDSON, 2004; MIRANDA-RIUS; BRUNET-LLOBET; LAHOR-SOLER, 2018), no entanto, consegue sensibilizar as fibras nervosas periféricas através de mediadores da inflamação, como: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , CINC-1/IL-8 e PGE<sub>2</sub>, tornando-as hiperexcitadas com limiar de ativação reduzido e aumento da capacidade de resposta (CHICHORRO; LORENZETTI; ZAMPRONIO, 2004; SESSLE, 2000; 2005; 2011;

WOLLER et al., 2017). Na presença, portanto, de um segundo estímulo doloroso mecânico ou químico (formalina em dose subliminar), ocorre uma somatização nas terminações com aumento do comportamento hipernociceptivo. Intrigantemente a resposta não se mantém com o passar dos dias, devido a uma possível inibição por mecanismos endógenos (FERREIRA et al., 2017; DE AVILA et al., 2004; GAURILCIKAITE; RENTON; GRANT, 2017a).

Para avaliar outros possíveis mecanismos de sensibilização periférica associados à liberação de mediadores químicos, analisamos os níveis dos neuropeptídeos SP e CGRP e do aminoácido GLu na gengiva, liberados antidromicamente pelas terminações nervosas periféricas, que caracterizaria a inflamação neurogênica. Essas dosagens também foram realizadas em tecidos neurais periféricos e centrais, gânglio trigeminal e subnúcleo caudal, respectivamente, a fim de avaliar se ocorria alteração desses neurotransmissores durante o desenvolvimento da PE (SESSLE, 2005b, 2008; DE AVILA et al., 2014).

Não foram observadas diferenças nos níveis dos neurotransmissores nos tecidos dos animais, não havendo, portanto, inflamação neurogênica periférica nem alteração de transmissão neural entre o sistema nervoso periférico e central. Esses achados corroboram com estudo clássico de Luthman et al., em 1989, que constatou a presença aumentada de fibras imunorreativas para SP e CGRP no tecido gengival de humanos, porém não havia diferença estatística entre o grupo saudável e o grupo periodontite. Nosso estudo também entrou em consonância com os estudos de Chen et al. (2000) e Pablik et al. (2017), que avaliaram a presença desses neuropeptídeos na gengiva e na saliva de humanos durante a DP, respectivamente, e não obtiveram diferenças entre o grupo periodontite e normal. Em contraste, Lundy et al. (2000) que avaliaram a presença desses neuropeptídeos SP e CGRP no fluido crevicular gengival (FCG) em indivíduos saudáveis e com periodontite e encontraram aumento dos níveis de SP e redução de CGRP. Também, Pradeep et al., em 2009 que constataram aumento dos níveis de SP no FCG e no plasma de humanos com periodontite, discutindo que o aumento dos níveis de SP no plasma poderia favorecer o desenvolvimento de doenças crônicas.

Em nosso estudo foi observado um aumento do GLu no tecido gengival, mas sem diferenças estatísticas. Em estudo de Téllez et al., em 2008, os níveis de Glu no fluido crevicular gengival (FCG) apresentaram-se reduzidos e o indicaram como possível biomarcador para DP. Na pesquisa de Syrjänen et al., em 1990, obteve-se que o glutamato no FCG foi significativamente elevado em pacientes com periodontite. Em uma outra perspectiva, Breivik et al. (2001), avaliando os efeitos da administração de GLu em fase pós-natal em ratos em um

modelo de periodontite induzida por ligadura, revelaram que o GLu foi responsável por desenvolver significativamente mais destruição do tecido periodontal em comparação com os ratos normais, tanto nos dentes com ligadura como nos dentes sem, e concluíram que a regulação imuno-neuroendócrina inadequada de GLu no cérebro pode desempenhar um papel na suscetibilidade e progressão da DP. Essa contradição oriunda de vários estudos presentes na literatura, pode advir de uma variação dos tecidos analisados, bem como na diferença entre modelos, necessitando de mais estudos para desvendar a interferência dos neuropeptídeos nos tecidos periféricos na periodontite.

No gânglio trigeminal, nosso estudo mostrou presença dos neuropeptídios semelhante ao normal. Em um estudo de Abd EL-aleem; Morales-Aza; Donaldson, em 2004, com indução da periodontite através da injeção de LPS em ratos, foram demonstrados aumentos da expressão de mRNA de SP e CGRP no ramo mandibular ipsi e contralateral do trigêmeo. Em outro estudo mais recente, Gašperšič et al., em 2008, utilizando um modelo de periodontite por ligadura, fizeram uso de identificador de neurônios retrógrados (Fluorogold -FG) aplicado no sulco gengival. Constataram aumento de SP e CGRP na região maxilar do trigêmeo. Além disso, maior aumento de SP ocorreu no ramo contralateral do GT. Em nosso estudo nós utilizamos a remoção do GT integralmente, no lado ipsilateral. Ademais, utilizamos o teste de Elisa que quantifica os níveis de proteínas nos tecidos, diferente dos estudos anteriores que relatam apenas a expressão do mRNA, e sabe-se que ocorrem interferências durante o processamento das proteínas, e que não necessariamente os níveis de mRNA corresponderão aos níveis de proteínas nos tecidos (MATHEWS; SONENBERG; HERSHEY, 2007).

No subnúcleo caudal, os níveis de SP, CGRP e GLu também mantiveram uma concentração semelhante entre os animais com PE e normais. Nosso estudo é o primeiro a avaliar os níveis desses neurotransmissores no subnúcleo caudal durante a PE. Sabe-se que o subnúcleo caudal tem sido especialmente implicado em mecanismos nociceptivos orofaciais, com base em achados comportamentais, anatômicos e imunocitoquímicos. Essa estrutura do complexo sensitivo trigeminal é responsável por liberar diversos neuropeptídeos, bem como ATP, e aminoácidos excitatórios como o glutamato que excitam neurônios nociceptivos de segunda ordem (NS e WDR) (DUBNER; SESSLE; STOREY, 1978; DUBNER; BENNETT, 1983; SESSLE, 2000; 2005a; 2005b; 2008b; CHIANG et al., 2005; 2007). Esses dois tipos neurônios de segunda ordem, por sua vez, são responsáveis por processar e retransmitir informações aferentes nociceptivas para centros cerebrais superiores (ex. tálamo ou centros locais (tronco cerebral) envolvido no reflexo autonômico a respostas evocadas por estímulos

orofaciais nocivos (DUBNER; SESSLE; STOREY, 1978; DUBNER; BENNETT, 1983; SESSLE, 2000; 2005a; 2005b; 2008b; 2011). A manutenção dos níveis de tais neurotransmissores nos neurônios nociceptivos no sistema trigeminal central implica na ausência de sensibilização central, o que justifica o fato de a resposta nociceptiva não se perpetuar (DUBNER; SESSLE; STOREY, 1978; SESSLE, 2000; 2005a; 2008b; 2011; DUBNER; REN, 2004; BEREITER, 2007; CHIANG et al., 2007). A inalteração dos níveis desses neurotransmissores no GT e SC pode contribuir para a ausência de sintomatologia dolorosa na doença periodontal, como de fato ocorreu no transcorrer do curso-temporal da doença, levando-nos a sugerir que o processo de neurotransmissão durante a PE não se encontra alterado, apesar da resposta inflamatória local, ratificando a hipótese de uma possível inibição da resposta nociceptiva por mecanismos endógenos.

Para compreender a preservação dos níveis dos neurotransmissores na PE, avaliamos a expressão do receptor vaniloide TRPV1, que é amplamente expresso nos neurônios sensoriais do GT, e está associado à integração de estímulos nociceptivos nocivos. Visto que em tecidos neurais, o TRPV1 é quase que exclusivamente expresso nas fibras C, portanto uma fibra aferente primária, optou-se por realizar a imuno-histoquímica no tecido neural periférico, o gânglio trigeminal (KOBAYASHI et al., 2005; SIEMENS et al., 2006; CATERINA et al., 1997; 2000; TOMINAGA; CATERINA, 2004).

Em nosso estudo, a expressão do TRPV1 mostrou-se semelhante nos neurônios do GT entre os grupos PE e normal, sugerindo que esses receptores estejam ativados de forma semelhante entre os grupos. Sabe-se que TRPV1 é ativado na presença de mediadores inflamatórios, como prostaglandina E2, substância P, glutamato, leucotrienos e citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e INF- $\gamma$ ), e que tal receptor participa do processo de liberação de neurotransmissores, levando à transmissão dos sinais nocivos ao sistema nervoso central e, conseqüentemente, à produção de sensações desagradáveis e dolorosas incluindo hiperalgesia térmica, alodinia mecânica e dor espontânea (CATERINA et al., 2000; BHAVE; GEREAU, 2004; MA; QUIRION, 2007; (PATAPOUTIAN; TATE; WOOLF, 2009; CAO et al., 2013; JULIUS, 2013; LIS et al., 2017). Os níveis semelhantes de TRPV1 entre os grupos, portanto, corroboram com a manutenção dos níveis dos neurotransmissores e a não evolução dos processos dolorosos. Isso poderia ocorrer, possivelmente, devido a uma inibição de TRPV1 pela via opioide, tendo em vista que a supressão de TRPV1 é um mecanismo subjacente ao efeito antinociceptivo dos agonistas de MOR na ação periférica da dor (MA; QUIRION, 2007).

Em nosso estudo, realizamos a expressão gênica dos receptores opioides na GE, e no GT, realizamos em conjunto com a expressão gênica a dosagem de proteínas para os receptores  $\mu$  e  $\kappa$ . Periféricamente, na gengiva, o início da ativação gênica de MOR e KOR ocorreu mais cedo do que no gânglio trigeminal, no 7º dia de PE, e se prolongou até o 11º dia mediado por MOR. No GT, no entanto, o aumento de ambos os receptores iniciou a partir do 11º dia da PE e se prolongou custeado por MOR até o 14º dia, corroborando com os resultados da expressão proteica, por *Western Blotting*, dos receptores MOR e KOR. Atribui-se, portanto, o aumento da expressão dos receptores opioides ao início da perda óssea inflamatória, a partir do 7º dia de PE.

Em consonância com nosso estudo, Queiroz-Junior et al. (2013) avaliaram o envolvimento dos opioides endógenos em um modelo de periodontite induzida por ligadura e observaram uma progressão da perda óssea alveolar inflamatória após 7 dias da indução. Ao se administrar o antagonista opioide naloxona localmente, houve aumento da perda óssea, inferindo que os opioides endógenos protegem o hospedeiro da progressão da perda óssea alveolar inflamatória que ocorre na periodontite crônica. Os autores, entretanto, não especificaram os tipos de receptores opioides envolvidos e limitaram-se a avaliar apenas o início da progressão da doença. De forma semelhante, Pacheco et al., em 2008, já haviam constatado que a ativação por um agonista no receptor KOR na periodontite experimental foi capaz de reduzir a perda de tecidos periodontais, sem alterar o número de leucócitos no periodonto inflamado, mostrando o efeito benéfico dos opioides, principalmente do KOR periféricamente.

Sabe-se que os receptores opioides são amplamente expressos em nociceptores do gânglio trigeminal e que podem reduzir a neurotransmissão da dor na periferia para o sistema nervoso central (JAGLA; MARTUS; STEIN, 2014; LABUZ et al., 2007; WEIBEL et al., 2013; (ZOLLNER et al., 2003; LABUZ et al., 2007; WEIBEL et al., 2013 JAGLA; MARTUS; STEIN, 2014) Também já é amplamente aceito na literatura que a presença de citocinas pró-inflamatórias, como as interleucinas IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6 e TNF- $\alpha$  induzem o aumento da expressão de MOR e KOR nas células (VIDAL et al., 1998; KRAUS, 2002; BÖRNER; HÖLLT; KRAUS et al., 2001; BORNER, 2004; QUEIROZ-JUNIOR et al., 2013), inferindo que o aumento desses receptores na PE ocorreu devido ao aumento de tais mediadores. Portanto, sugere-se que a periodontite experimental produz uma sensibilização periférica custeada por mediadores inflamatórios (GRIESBACHER; SUTLIFF; LEMBECK, 1994) que encontraram-se aumentadas na PE, como citocinas TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e pela PGE<sub>2</sub> no 11º dia, e que essa sensibilização é inibida por opioides endógenos prevenindo a projeção da transmissão

periférica para o sistema nervoso central, resultando na ausência de sintomatologia dolorosa no transcorrer da doença (ABD EL-ALEEM et al., 2005; FERREIRA et al., 2017; GAURILCIKAITE; RENTON; GRANT, 2017;SUZUKI et al., 2017). Esse efeito na inibição central da PE causada por opioides, pode ser explicada por sua ação sobre TRPV1 e através da manutenção dos níveis dos neurotransmissores excitatórios SP, CGRP, GLu (CANO et al., 1999; BINGEL; TRACEY, 2008).

## CONCLUSÃO

Nossos resultados sugerem que a PE evoca uma sensibilização periférica no 11º dia mediada pelas citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8 e pela PGE<sub>2</sub>, porém não aumenta a ativação TRPV1 em neurônios, assim como não altera liberação dos neurotransmissores SP, CGRP e GLu. Concomitantemente, ocorre uma inibição endógena da dor através da ativação dos receptores opioides  $\mu$  e  $\kappa$  nas fibras aferentes primárias e no gânglio sensitivo trigeminal, o que explica o fato de pacientes com periodontite não apresentarem sintomatologia dolorosa.

## Conflito de Interesses

Os autores negam quaisquer conflitos de interesse relacionados a este estudo.

## Agradecimentos

Agradecemos ao Prof. Sessle por suas contribuições para concepção e delineamento do estudo. Agradecemos à Prof.<sup>a</sup> Dra. Virginia Cláudia Carneiro Girão, à Prof.<sup>a</sup> Dra. Mirna Marques Bezerra e ao Técnico Adalberto Nascimento de Lima Junior pelo suporte e ajuda na execução do teste de imuno-histoquímica. Ao Dr. José Jackson do Nascimento Costa pela ajuda na execução e análises da qRT-PCR. À Dra. Conceição da Silva Martins e ao laboratório NEMPI pela parceria e ajuda na execução do *Western Blotting*. Agradecemos à CAPES, à FUNCAP e ao CNPQ pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS

- ABD EL-ALEEM, S. A.; MORALES-AZA, B. M.; DONALDSON, L. F. Sensory neuropeptide mRNA up-regulation is bilateral in periodontitis in the rat: A possible neurogenic component to symmetrical periodontal disease. **European Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 3, p. 650–658, 2004.
- ALEXANDRE, J. T. M. et al. Anti-inflammatory and antiresorptive effects of *Calendula officinalis* on inflammatory bone loss in rats. **Clinical Oral Investigations**, v. 22, n. 6, p.

2175–2185, 29 jul. 2018.

ARAÚJO, A. A. et al. Effect of telmisartan on levels of IL-1, TNF- $\alpha$ , down-regulated COX-2, MMP-2, MMP-9 and RANKL/RANK in an experimental periodontitis model. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 40, n. 12, p. 1104–1111, dez. 2013.

BEREITER, D. A. Trigeminal Brainstem Nuclear Complex, Immunohistochemistry and Neurochemistry. In: SCHMIDT, R. F.; WILLIS, W. D. (Eds.). . **Encyclopedia of Pain**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2007. p. 2541–2543.

BEZERRA, M. M. et al. Selective Cyclooxygenase-2 Inhibition Prevents Alveolar Bone Loss in. **Journal of periodontology**, n. June, p. 1009–1014, 2000.

BHAVE, G.; GEREAU, R. W. Posttranslational mechanisms of peripheral sensitization. **Journal of Neurobiology**, v. 61, n. 1, p. 88–106, out. 2004.

BÖRNER, C.; HÖLLT, V.; KRAUS, J. Involvement of activator protein-1 in transcriptional regulation of the human mu-opioid receptor gene. **Molecular pharmacology**, v. 61, n. 4, p. 800–5, 2002.

BREIVIK, T. et al. Postnatal glutamate-induced central nervous system lesions alter periodontal disease susceptibility in adult Wistar rats. **Journal of clinical periodontology**, v. 28, n. 10, p. 904–9, out. 2001.

BURNETTE, W. N. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. **Analytical biochemistry**, v. 112, n. 2, p. 195–203, abr. 1981.

CANO, G. et al. Multiphasic morphine modulation of substance P release from capsaicin-sensitive primary afferent fibers. **Neurochemical research**, v. 24, n. 10, p. 1203–7, out. 1999.

CAO, E. et al. TRPV1 structures in distinct conformations reveal activation mechanisms. **Nature**, v. 504, n. 7478, p. 113–118, 5 dez. 2013.

CATERINA, M. J. et al. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, v. 389, n. 6653, p. 816–824, 23 out. 1997.

CATERINA, M. J. et al. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. **Science (New York, N.Y.)**, v. 288, n. 5464, p. 306–13, 14 abr. 2000.

CHAVES, H. V. et al. Experimental Model of Zymosan-Induced Arthritis in the Rat Temporomandibular Joint: Role of Nitric Oxide and Neutrophils. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, p. 1–11, 2011.

CHAVES, H. V. et al. Heme oxygenase-1/biliverdin/carbon monoxide pathway downregulates hypernociception in rats by a mechanism dependent on cGMP/ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. **Inflammation Research**, v. 67, n. 5, p. 407–422, 2018.

CHEN, S. et al. An investigation of immunocompetence substances in normal gingival and periodontitis tissue. **Chinese medical journal**, v. 113, n. 9, p. 844–7, set. 2000.

CHIANG, C.-Y. et al. Astroglial Glutamate Glutamine Shuttle Is Involved in Central Sensitization of Nociceptive Neurons in Rat Medullary Dorsal Horn. **Journal of**

**Neuroscience**, v. 27, n. 34, p. 9068–9076, 22 ago. 2007.

CHIANG, C. Y. et al. Endogenous ATP Involvement in Mustard-Oil-Induced Central Sensitization in Trigeminal Subnucleus Caudalis (Medullary Dorsal Horn). **Journal of Neurophysiology**, v. 94, n. 3, p. 1751–1760, set. 2005.

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

CHICHORRO, J. G.; PORRECA, F.; SESSLE, B. Mechanisms of craniofacial pain. **Cephalalgia**, v. 37, n. 7, p. 613–626, 2017.

CLAVELOU, P. et al. The orofacial formalin test in rats: effects of different formalin concentrations. **Pain**, v. 62, n. 3, p. 295–301, set. 1995.

CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. Peripheral hyperalgesic cytokines. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 521, p. 22–39, 2003.

CUNHA, F. Q.; TEIXEIRA, M. M.; FERREIRA, S. H. Pharmacological modulation of secondary mediator systems--cyclic AMP and cyclic GMP--on inflammatory hyperalgesia. **British journal of pharmacology**, v. 127, n. 3, p. 671–8, jun. 1999.

CUNHA, T. M. et al. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. v. 102, n. 5, p. 1755–1760, 2005.

CUNHA, T. M. et al. Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 83, n. 4, p. 824–832, 2008.

DE AVILA, E. D. ORIGATT. et al. Increased Expression of Glutaminase in Osteoblasts Promotes Macrophage Recruitment in Periapical Lesions. **Journal of Periodontology**, v. 19, n. 2, p. 731–736, 24 abr. 2004.

DE AVILA, E. D. ORIGATT. et al. Relationship between levels of neuropeptide Substance P in periodontal disease and chronic pain: a literature review. **Journal of investigative and clinical dentistry**, v. 5, n. 2, p. 91–97, 2014.

DE LIMA, V. et al. Effects of chlorpromazine on alveolar bone loss in experimental periodontal disease in rats. **European journal of oral sciences**, v. 108, n. 2, p. 123–9, abr. 2000.

DENADAI-SOUZA, A. et al. Participation of peripheral tachykinin NK1 receptors in the carrageenan-induced inflammation of the rat temporomandibular joint. **European Journal of Pain**, v. 13, n. 8, p. 812–819, set. 2009.

DS, B.; AJ, S.; KF, R. HARM / ETIOLOGY A RTICLE A NALYSIS & E VALUATION Pain and Discomfort are the Main Symptoms Affecting the Quality of Life in Periodontal Disease. p. 101–102, 2008.

DUBNER, R.; BENNETT, G. J. Mechanisms of Nociception1. **Ann. Rep. Neurosci.**, v. 6, p. 381–418, 1983.

DUBNER, R.; REN, K. Brainstem mechanisms of persistent pain following injury. **Journal**

of orofacial pain, v. 18, n. 4, p. 299–305, 2004.

DUBNER, R.; SESSLE, B. J.; STOREY, A. T. **The Neural Basis of Oral and Facial Function**. [s.l.] Springer US, 1978.

DUMITRESCU, A. L. et al. A model of periodontitis in the rat: Effect of lipopolysaccharide on bone resorption, osteoclast activity, and local peptidergic innervation. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 31, n. 8, p. 596–603, 2004.

DURHAM, J. et al. Impact of periodontitis on oral health-related quality of life. v. 1, p. 3–9, 2013.

DUTZAN, N. et al. Host response mechanisms in periodontal diseases. **Journal of Applied Oral Science**, v. 23, n. 3, p. 329–355, 2015.

ENGVALL, E.; PERLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. **Immunochemistry**, v. 8, n. 9, p. 871–4, set. 1971.

FERREIRA, M. C. et al. Impact of periodontal disease on quality of life: a systematic review. **Journal of Periodontal Research**, v. 52, n. 4, p. 651–665, 2017.

FERREIRA, S. H.; NAKAMURA, M. I - Prostaglandin hyperalgesia, a cAMP/Ca<sup>2+</sup> dependent process. **Prostaglandins**, v. 18, n. 2, p. 179–90, ago. 1979.

GAŠPERŠIČ, R. et al. Unilateral ligature-induced periodontitis influences the expression of neuropeptides in the ipsilateral and contralateral trigeminal ganglion in rats. **Archives of Oral Biology**, v. 53, n. 7, p. 659–665, jul. 2008.

GAURILCIKAITE, E.; RENTON, T.; GRANT, A. The paradox of painless periodontal disease. **Oral Diseases**, v. 23, n. 4, p. 451–463, maio 2017a.

GAURILCIKAITE, E.; RENTON, T.; GRANT, A. The paradox of painless periodontal disease. **Oral Diseases**, v. 23, n. 4, p. 451–463, maio 2017b.

GIANNOBILE, W. V. Host-Response Therapeutics for Periodontal Diseases. **Journal of Periodontology**, v. 79, n. 8s, p. 1592–1600, 2008.

GOES, P. et al. Effect of Atorvastatin in radiographic density on alveolar bone loss in wistar rats. **Brazilian Dental Journal**, v. 21, n. 3, p. 193–198, 2010.

GOES, P. et al. Effect of alendronate on bone-specific alkaline phosphatase on periodontal bone loss in rats. **Archives of Oral Biology**, v. 57, n. 11, p. 1537–1544, nov. 2012.

GONÇALVES, D. C. et al. Infliximab attenuates inflammatory osteolysis in a model of periodontitis in Wistar rats. **Experimental Biology and Medicine**, v. 239, n. 4, p. 442–453, 28 abr. 2014.

GRIESBACHER, T.; SUTLIFF, R. L.; LEMBECK, F. Anti-inflammatory and analgesic activity of the bradykinin antagonist, icatibant (Hoe 140), against an extract from *Porphyromonas gingivalis*. **British Journal of Pharmacology**, v. 112, n. 4, p. 1004–1006, 1994.

GYÖRFI, A.; FAZEKAS; ROSIVALL, L. Neurogenic inflammation and the oral mucosa. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 19, n. 10, p. 731–736, 1992.

- KRAUS, J. et al. Regulation of  $\mu$ -Opioid Receptor Gene Transcription by Interleukin-4 and Influence of an Allelic Variation within a STAT6 Transcription Factor Binding Site. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 47, p. 43901–43908, 23 nov. 2001.
- LABUZ, D. et al. Relative contribution of peripheral versus central opioid receptors to antinociception. **Brain Research**, v. 1160, p. 30–38, jul. 2007.
- LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. W. [Acute pain measurement in animals. Part 1]. **Annales francaises d'anesthesie et de reanimation**, v. 20, n. 4, p. 347–65, abr. 2001a.
- LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. W. [Critical analysis of animal models of acute pain. II]. **Annales francaises d'anesthesie et de reanimation**, v. 20, n. 5, p. 452–70, maio 2001b.
- LIS, K. et al. Inhibition of TNF reduces mechanical orofacial hyperalgesia induced by Complete Freund's Adjuvant by a TRPV1-dependent mechanism in mice. **Pharmacological reports : PR**, v. 69, n. 6, p. 1380–1385, dez. 2017.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, dez. 2001.
- LOO, W. T. et al. Gene polymorphism and protein of human pro- and anti-inflammatory cytokines in Chinese healthy subjects and chronic periodontitis patients. **Journal of Translational Medicine**, v. 10, n. Suppl 1, p. S8, 19 set. 2012.
- LUNDY, F. T. et al. Changes in substance P and neurokinin A in gingival crevicular fluid in response to periodontal treatment. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 27, n. 7, p. 526–530, 2000.
- LUTHMAN, J. et al. Immunohistochemical study of neurochemical markers in gingiva obtained from periodontitis-affected sites. **Journal of Periodontal Research**, v. 24, n. 4, p. 267–278, 1989.
- MA, W.; QUIRION, R. Inflammatory mediators modulating the transient receptor potential vanilloid 1 receptor: therapeutic targets to treat inflammatory and neuropathic pain. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 11, n. 3, p. 307–320, 14 mar. 2007.
- MATHEWS, M.; SONENBERG, N.; HERSHEY, J. 1 Origins and Principles of Translational Control. **Cold Spring Harbor Monograph Archive**, v. 48, n. 0, 2007.
- MIRANDA-RIUS, J.; BRUNET-LLOBET, L.; LAHOR-SOLER, E. The Periodontium as a Potential Cause of Orofacial Pain: A Comprehensive Review. **The Open Dentistry Journal**, v. 12, n. 1, p. 520–528, 2018.
- OFFENBACHER, S.; HEASMAN, P. A.; COLLINS, J. G. Modulation of Host PGE<sub>2</sub> Secretion as a Determinant of Periodontal Disease Expression. **Journal of Periodontology**, v. 64, n. 5s, p. 432–444, maio 1993.
- OSSIPOV, M. H. et al. Central modulation of pain Find the latest version : Review series Central modulation of pain. v. 120, n. 11, p. 3779–3787, 2010.
- PABLIK, E. et al. Salivary Neuropeptides, Stress and Periodontitis. **Journal of Periodontology**, n. April, p. 1–15, 2017.

- PACHECO, C. M. F. et al. Crucial role of peripheral  $\kappa$ -opioid receptors in a model of periodontal disease in rats. **Journal of Periodontal Research**, v. 43, n. 6, p. 730–736, dez. 2008.
- PATAPOUTIAN, A.; TATE, S.; WOOLF, C. J. Transient receptor potential channels: targeting pain at the source. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 8, n. 1, p. 55–68, jan. 2009.
- PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. [s.l.] Elsevier, 2007.
- PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic acids research**, v. 29, n. 9, p. e45, 1 maio 2001.
- PRADEEP, A. R. et al. Gingival crevicular fluid and plasma levels of neuropeptide Substance-P in periodontal health, disease and after nonsurgical therapy. **Journal of Periodontal Research**, v. 44, n. 2, p. 232–237, abr. 2009.
- QUEIROZ-JUNIOR, C. M. et al. Endogenous opioids regulate alveolar bone loss in a periodontal disease model. **Life Sciences**, v. 93, n. 12–14, p. 471–477, 6 out. 2013.
- REN, K. An improved method for assessing mechanical allodynia in the rat. **Physiology and Behavior**, v. 67, n. 5, p. 711–716, 1999.
- RIBEIRO, D. DA S. F. et al. Tocoyena sellowiana extract decreases bone loss in an experimental model of periodontitis in rats: Putative role for cyclooxygenase-2 and IL-1 $\beta$  inhibition. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 98, p. 863–872, fev. 2018.
- SÁNCHEZ, G. A. et al. Salivary IL-1 $\beta$  and PGE<sub>2</sub> as biomarkers of periodontal status, before and after periodontal treatment. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 40, n. 12, p. 1112–1117, dez. 2013.
- SESSLE, B. J. et al. Convergence of cutaneous, tooth pulp, visceral, neck and muscle afferents onto nociceptive and non-nociceptive neurones in trigeminal subnucleus caudalis (medullary dorsal horn) and its implications for referred pain. **Pain**, v. 27, n. 2, p. 219–35, nov. 1986.
- SESSLE, B. J. Acute and Chronic Craniofacial Pain: Brainstem Mechanisms of Nociceptive Transmission and Neuroplasticity, and Their Clinical Correlates. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 11, n. 1, p. 57–91, 1 jan. 2000.
- SESSLE, B. J. Awareness of pain awareness. **Journal of orofacial pain**, v. 19, n. 1, p. 5, 2005a.
- SESSLE, B. J. Peripheral and central mechanisms of orofacial pain and their clinical correlates. **Minerva anesthesiologica**, v. 71, n. 4, p. 117–36, abr. 2005b.
- SESSLE, B. J. Trigeminal Central Sensitization. **Reviews in Analgesia**, v. 8, n. 2, p. 85–102, 2008.
- SESSLE, B. J. Peripheral and central mechanisms of orofacial inflammatory pain. In: **International review of neurobiology**. [s.l.: s.n.]. v. 97p. 179–206.
- SIEMENS, J. et al. Spider toxins activate the capsaicin receptor to produce inflammatory pain. **Nature**, v. 444, n. 7116, p. 208–212, 9 nov. 2006.

- SILVA, N. et al. Host response mechanisms in periodontal diseases. **Journal of Applied Oral Science**, v. 23, n. 3, p. 329–355, jun. 2015.
- SOUSA, L. H. et al. Effects of atorvastatin on periodontitis of rats subjected to glucocorticoid-induced osteoporosis. **Journal of Periodontology**, v. 87, n. 10, 2016.
- SOUZA, A. L. S. et al. In vivo evidence for a role of protein kinase C in peripheral nociceptive processing. **British journal of pharmacology**, v. 135, n. 1, p. 239–47, jan. 2002.
- SUZUKI, T. et al. CXCR4 signaling in macrophages contributes to periodontal mechanical hypersensitivity in Porphyromonas gingivalis -induced periodontitis in mice . **Molecular Pain**, v. 13, p. 174480691668926, 2017.
- SYRJÄNEN, S. M. et al. Free amino acid levels in oral fluids of normal subjects and patients with periodontal disease. **Archives of oral biology**, v. 35, n. 3, p. 189–93, 1990.
- TAIWO, Y. O.; LEVINE, J. D. Prostaglandin effects after elimination of indirect hyperalgesic mechanisms in the skin of the rat. **Brain research**, v. 492, n. 1–2, p. 397–9, 17 jul. 1989.
- TEIXEIRA, A. H. et al. Stemodia maritima L. Extract Decreases Inflammation, Oxidative Stress, and Alveolar Bone Loss in an Experimental Periodontitis Rat Model. **Frontiers in Physiology**, v. 8, p. 988, 1 dez. 2017.
- TÉLLEZ, N. et al. Arginine and glutamate levels in the gingival crevicular fluid from patients with chronic periodontitis. **Brazilian dental journal**, v. 19, n. 4, p. 318–22, 2008.
- TOMINAGA, M.; CATERINA, M. J. Thermosensation and pain. **Journal of Neurobiology**, v. 61, n. 1, p. 3–12, out. 2004.
- TOWBIN, H.; STAEHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 76, n. 9, p. 4350–4354, 1 set. 1979.
- TRINDADE, F. et al. Uncovering the molecular networks in periodontitis. **PROTEOMICS - Clinical Applications**, v. 8, n. 9–10, p. 748–761, out. 2014.
- WATASE, T. et al. Involvement of transient receptor potential vanilloid 1 channel expression in orofacial cutaneous hypersensitivity following tooth pulp inflammation. **Journal of Oral Science**, v. 60, n. 1, p. 8–13, 2018.
- WOLLER, S. A. et al. An overview of pathways encoding nociception. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 35, n. 5, p. S40–S46, 2017.
- ZHANG, X.-C. et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  induces sensitization of meningeal nociceptors mediated via local COX and p38 MAP kinase actions. **Pain**, v. 152, n. 1, p. 140–149, jan. 2011.
- ZHANG, X.; BURSTEIN, R.; LEVY, D. Local action of the proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and IL-6 on intracranial meningeal nociceptors. **Cephalalgia**, v. 32, n. 1, p. 66–72, 5 jan. 2012.
- ZIMMERMANN MANFRED. Ethical Guidelines for investigations of Experimental Pain in Conscious Animals. **Pain**, v. 16, n. 2, p. 109–110, 1983.

## REFERÊNCIAS

- A. MEYER, R. et al. Peripheral mechanisms of cutaneous nociception. In: **Wall and Melzack's Textbook of Pain**. [s.l: s.n.]. p. 3–34.
- ABD EL-ALEEM, S. A.; MORALES-AZA, B. M.; DONALDSON, L. F. Sensory neuropeptide mRNA up-regulation is bilateral in periodontitis in the rat: A possible neurogenic component to symmetrical periodontal disease. **European Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 3, p. 650–658, 2004.
- AITA, M. et al. Trigeminal Injury Causes kappa Opioid-Dependent Allodynic, Glial and Immune Cell Responses in Mice. **Molecular Pain**, v. 6, p. 1744-8069-6–8, 29 jan. 2010.
- ALEXANDRE, J. T. M. et al. Anti-inflammatory and antiresorptive effects of *Calendula officinalis* on inflammatory bone loss in rats. **Clinical Oral Investigations**, v. 22, n. 6, p. 2175–2185, 29 jul. 2018.
- ALVES, S. M. et al. The efficacy of a lectin from *Abelmoschus Esculentus* depends on central opioid receptor activation to reduce temporomandibular joint hypernociception in rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 101, p. 478–484, maio 2018.
- ARAÚJO, M. G.; SUKEKAVA, F. **Revista Periodontia**. [s.l.] [s.n.], 2007. v. 17
- ARAYA, E. I. et al. Role of peripheral and central TRPV1 receptors in facial heat hyperalgesia in streptozotocin-induced diabetic rats. **Brain Research**, v. 1670, p. 146–155, 1 set. 2017.
- ASSAS, B. M.; PENNOCK, J. I.; MIYAN, J. A. Calcitonin gene-related peptide is a key neurotransmitter in the neuro-immune axis. **Frontiers in Neuroscience**, v. 8, p. 23, 2014.
- AZUMA, H. et al. Substance P Enhances the Inhibition of Osteoblastic Cell Differentiation Induced by Lipopolysaccharide From *Porphyromonas gingivalis*. **Journal of Periodontology**, v. 75, n. 7, p. 974–981, 2005.
- BĂLAN, H. Do cardio-vascular and periodontal diseases have a close, causal relationship? **Romanian journal of internal medicine = Revue roumaine de medecine interne**, v. 48, n. 2, p. 121–9, 2010.
- BELL-KROTOSKI, J.; TOMANCIK, E. The repeatability of testing with Semmes-Weinstein monofilaments. **The Journal of hand surgery**, v. 12, n. 1, p. 155–61, jan. 1987.
- BERG, K. A. et al. Regulation of  $\mu$ -Opioid Receptor Signaling in Peripheral Sensory Neurons In Vitro and In Vivo. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 338, n. 1, p. 92–99, 1 jul. 2011.
- BHAVE, G.; GEREAU, R. W. Posttranslational mechanisms of peripheral sensitization. **Journal of Neurobiology**, v. 61, n. 1, p. 88–106, out. 2004.
- BÖRNER, C.; HÖLLT, V.; KRAUS, J. Involvement of activator protein-1 in transcriptional regulation of the human  $\mu$ -opioid receptor gene. **Molecular pharmacology**, v. 61, n. 4, p. 800–5, 2002.

- BRAUCHI, S. et al. A Hot-Sensing Cold Receptor: C-Terminal Domain Determines Thermosensation in Transient Receptor Potential Channels. **Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 18, p. 4835–4840, 3 maio 2006.
- BUHLIN, K. et al. Risk factors for cardiovascular disease in patients with periodontitis. **European Heart Journal**, v. 24, n. 23, p. 2099–2107, 2003.
- CAIRNS, B. E. Pathophysiology of TMD pain - basic mechanisms and their implications for pharmacotherapy. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 37, n. 6, p. 391–410, 11 maio 2010.
- CAIRNS, B. E.; REN, K.; TAMBELI, C. H. Musculoskeletal orofacial pain mechanisms: insights from animal models. In: SESSLE, B. J. (Ed.). . **Orofacial Pain**. [s.l.] IASP Press, 2014. p. 351–372.
- CANO, G. et al. Multiphasic morphine modulation of substance P release from capsaicin-sensitive primary afferent fibers. **Neurochemical research**, v. 24, n. 10, p. 1203–7, out. 1999.
- CAO, E. et al. TRPV1 structures in distinct conformations reveal activation mechanisms. **Nature**, v. 504, n. 7478, p. 113–118, 5 dez. 2013.
- CATERINA, M. J. et al. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, v. 389, n. 6653, p. 816–824, 23 out. 1997.
- CATERINA, M. J. et al. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. **Science (New York, N.Y.)**, v. 288, n. 5464, p. 306–13, 14 abr. 2000.
- CHAVES, H. V. et al. Experimental Model of Zymosan-Induced Arthritis in the Rat Temporomandibular Joint: Role of Nitric Oxide and Neutrophils. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, p. 1–11, 2011.
- CHAVES, H. V. et al. Heme oxygenase-1/biliverdin/carbon monoxide pathway downregulates hypernociception in rats by a mechanism dependent on cGMP/ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. **Inflammation Research**, v. 67, n. 5, p. 407–422, 2018.
- CHEN, X. T. et al. Structure-activity relationships and discovery of a G protein biased  $\mu$  opioid receptor ligand, [(3-methoxythiophen-2-yl)methyl]({2-[(9 r)-9-(pyridin-2-yl)-6-oxaspiro-[4.5]decan-9-yl]ethyl})amine (TRV130), for the treatment of acute severe pain. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 56, n. 20, p. 8019–8031, 2013.
- CHEN, X.; TANNER, K.; LEVINE, J. D. Mechanical sensitization of cutaneous C-fiber nociceptors by prostaglandin E<sub>2</sub> in the rat. **Neuroscience letters**, v. 267, n. 2, p. 105–8, 28 maio 1999.
- CHICHORRO, J. G.; LORENZETTI, B. B.; ZAMPRONIO, A. R. Involvement of bradykinin, cytokines, sympathetic amines and prostaglandins in formalin-induced orofacial nociception in rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 141, n. 7, p. 1175–1184, 2004a.
- CHICHORRO, J. G.; LORENZETTI, B. B.; ZAMPRONIO, A. R. Involvement of bradykinin, cytokines, sympathetic amines and prostaglandins in formalin-induced orofacial nociception in rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 141, n. 7, p. 1175–1184,

2004b.

- CHICHORRO, J. G.; PORRECA, F.; SESSLE, B. Mechanisms of craniofacial pain. **Cephalalgia**, v. 37, n. 7, p. 613–626, 2017.
- CLAPHAM, D. E.; RUNNELS, L. W.; STRÜBING, C. The trp ion channel family. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 2, n. 6, p. 387–396, jun. 2001.
- CLARKE, W. P. et al. Functional Selectivity of Kappa Opioid Receptor Agonists in Peripheral Sensory Neurons. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 355, n. 2, p. 174–182, 2015.
- CLAVELOU, P. et al. Application of the formalin test to the study of orofacial pain in the rat. **Neuroscience letters**, v. 103, n. 3, p. 349–53, 11 set. 1989.
- CLAVELOU, P. et al. The orofacial formalin test in rats: effects of different formalin concentrations. **Pain**, v. 62, n. 3, p. 295–301, set. 1995.
- COHEN, M.; QUINTNER, J.; VAN RYSEWYK, S. Reconsidering the International Association for the Study of Pain definition of pain. **PAIN Reports**, v. 3, n. 2, p. e634, 2018.
- CUNHA, F. Q. et al. Interleukin-8 mediator of sympathetic pain. **Br. J. Pharmacol.**, v. 104, p. 765–767, 1991.
- CUNHA, F. Q. et al. The pivotal role of tumour necrosis factor  $\alpha$  in the development of inflammatory hyperalgesia. **British Journal of Pharmacology**, v. 107, n. 3, p. 660–664, 1992.
- CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. Peripheral hyperalgesic cytokines. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 521, p. 22–39, 2003.
- CUNHA, T. M. et al. **Mouse paw pressure-meter test Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/bjmbr/v37n3/5164.pdf>>. Acesso em: 9 abr. 2019.
- CUNHA, T. M. et al. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. v. 102, n. 5, p. 1755–1760, 2005.
- CUNHA, T. M. et al. Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 83, n. 4, p. 824–832, 2008.
- DALLEL, R. et al. Evidence for a peripheral origin of the tonic nociceptive response to subcutaneous formalin. **Pain**, v. 61, n. 1, p. 11–6, abr. 1995.
- DAVIS, J. B. et al. Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. **Nature**, v. 405, n. 6783, p. 183–187, 11 maio 2000.
- DE AVILA, E. D. ORIGATT. et al. Relationship between levels of neuropeptide Substance P in periodontal disease and chronic pain: a literature review. **Journal of investigative and clinical dentistry**, v. 5, n. 2, p. 91–97, 2014.

- DE FELICE, M.; OSSIPOV, M. H. Cortical and subcortical modulation of pain. **Pain Management**, v. 6, n. 2, p. 111–120, 2016.
- DE LIMA, V. et al. Effects of chlorpromazine on alveolar bone loss in experimental periodontal disease in rats. **European journal of oral sciences**, v. 108, n. 2, p. 123–9, abr. 2000.
- DENADAI-SOUZA, A. et al. Participation of peripheral tachykinin NK1 receptors in the carrageenan-induced inflammation of the rat temporomandibular joint. **European Journal of Pain**, v. 13, n. 8, p. 812–819, set. 2009.
- DEUIS, J. R. et al. An animal model of oxaliplatin-induced cold allodynia reveals a crucial role for Nav1.6 in peripheral pain pathways. **Pain**, v. 154, n. 9, p. 1749–1757, set. 2013.
- DEUIS, J. R. et al. Analgesic effects of clinically used compounds in novel mouse models of polyneuropathy induced by oxaliplatin and cisplatin. **Neuro-oncology**, v. 16, n. 10, p. 1324–32, out. 2014.
- DEUIS, J. R. et al. Activation of  $\kappa$  Opioid Receptors in Cutaneous Nerve Endings by Conorphin-1, a Novel Subtype-Selective Conopeptide, Does Not Mediate Peripheral Analgesia. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 6, n. 10, p. 1751–1758, 21 out. 2015.
- DEUIS, J. R.; DVORAKOVA, L. S.; VETTER, I. Methods Used to Evaluate Pain Behaviors in Rodents. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 10, n. September, p. 1–17, 2017.
- DHAKA, A. et al. TRPV1 is activated by both acidic and basic pH. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 29, n. 1, p. 153–8, 7 jan. 2009.
- Dor no Brasil - SBED - Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor.** Disponível em: <[http://sbed.go.mk.com.br/materias.php?cd\\_materias=168&codant=73&hl=epidemiologia&cd\\_secao=74&busca=1#168%3E](http://sbed.go.mk.com.br/materias.php?cd_materias=168&codant=73&hl=epidemiologia&cd_secao=74&busca=1#168%3E)>. Acesso em: 18 mar. 2019.>. Acesso em: 4 maio. 2019.
- DS, B.; AJ, S.; KF, R. HARM / ETIOLOGY ARTICLE ANALYSIS & EVALUATION Pain and Discomfort are the Main Symptoms Affecting the Quality of Life in Periodontal Disease. p. 101–102, 2008.
- DUBIN, A. E.; PATAPOUTIAN, A. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. **The Journal of clinical investigation**, v. 120, n. 11, p. 3760–72, nov. 2010.
- DUBNER, R.; BENNETT, G. J. Mechanisms of Nociception1. **Ann. Rep. Neurosci.**, v. 6, p. 381–418, 1983.
- DUBNER, R.; SESSLE, B. J.; STOREY, A. T. **The Neural Basis of Oral and Facial Function**. [s.l.] Springer US, 1978.
- DUMITRESCU, A. L. et al. A model of periodontitis in the rat: Effect of lipopolysaccharide on bone resorption, osteoclast activity, and local peptidergic innervation. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 31, n. 8, p. 596–603, 2004.
- DURHAM, J. et al. Impact of periodontitis on oral health-related quality of life. v. 1, p. 3–9,

2013.

DUTZAN, N. et al. Host response mechanisms in periodontal diseases. **Journal of Applied Oral Science**, v. 23, n. 3, p. 329–355, 2015.

FERREIRA, M. C. et al. Impact of periodontal disease on quality of life: a systematic review. **Journal of Periodontal Research**, v. 52, n. 4, p. 651–665, 2017.

FLORES, C. M. et al. **Capsaicin-evoked CGRP release from rat buccal mucosa: development of a model system for studying trigeminal mechanisms of neurogenic inflammation NIH Public Access** **Eur J Neurosci**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2814599/pdf/nihms168979.pdf>>. Acesso em: 4 maio. 2019.

GARCIA-SANZ, N. et al. Identification of a Tetramerization Domain in the C Terminus of the Vanilloid Receptor. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 23, p. 5307–5314, 9 jun. 2004.

GAURILCIKAITE, E.; RENTON, T.; GRANT, A. The paradox of painless periodontal disease. **Oral Diseases**, v. 23, n. 4, p. 451–463, maio 2017.

GERON, M.; HAZAN, A.; PRIEL, A. Animal Toxins Providing Insights into TRPV1 Activation Mechanism. **Toxins**, v. 9, n. 10, 2017.

GIANNOBILE, W. V. Host-Response Therapeutics for Periodontal Diseases. **Journal of Periodontology**, v. 79, n. 8s, p. 1592–1600, 2008.

GOES, P. et al. Effect of Atorvastatin in radiographic density on alveolar bone loss in wistar rats. **Brazilian Dental Journal**, v. 21, n. 3, p. 193–198, 2010.

GOULART, A. C. et al. Relationship between periodontal disease and cardiovascular risk factors among young and middle-aged Brazilians. Cross-sectional study. **Sao Paulo Medical Journal**, v. 135, n. 3, p. 226–233, jun. 2017.

GRIESBACHER, T.; SUTLIFF, R. L.; LEMBECK, F. Anti-inflammatory and analgesic activity of the bradykinin antagonist, icatibant (Hoe 140), against an extract from *Porphyromonas gingivalis*. **British Journal of Pharmacology**, v. 112, n. 4, p. 1004–1006, 1994.

GUENTHER, S.; REEH, P. W.; KRESS, M. Rises in  $[Ca^{2+}]_i$  mediate capsaicin- and proton-induced heat sensitization of rat primary nociceptive neurons. **The European journal of neuroscience**, v. 11, n. 9, p. 3143–50, set. 1999.

GYÖRFI, A.; FAZEKAS; ROSIVALL, L. Neurogenic inflammation and the oral mucosa. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 19, n. 10, p. 731–736, 1992.

HAJISHENGALLIS, G.; LAMONT, R. J.; GRAVES, D. T. The enduring importance of animal models in understanding periodontal disease. **Virulence**, v. 6, n. 3, p. 229–235, 3 abr. 2015.

HAZAN, A. et al. The pain receptor TRPV1 displays agonist-dependent activation stoichiometry. **Scientific reports**, v. 5, n. 1, p. 12278, 21 jul. 2015.

- HENSCHKE, N.; KAMPER, S. J.; MAHER, C. G. The epidemiology and economic consequences of pain. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 90, n. 1, p. 139–147, 2015.
- HOEIJMAKERS, J. G. et al. Small-fibre neuropathies—advances in diagnosis, pathophysiology and management. **Nature Reviews Neurology**, v. 8, n. 7, p. 369–379, 29 jul. 2012.
- HUNG, C. Y.; TAN, C. H. TRP channels in nociception and pathological pain. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1099, p. 13–27, 2018.
- JARDÍN, I. et al. TRPs in Pain Sensation. **Frontiers in Physiology**, v. 8, p. 392, 9 jun. 2017.
- JENSEN, K. et al. Pressure-pain threshold in human temporal region. Evaluation of a new pressure algometer. **Pain**, v. 25, n. 3, p. 313–23, 1 jun. 1986.
- JORDAN, B. A.; DEVI, L. A. G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. **Nature**, v. 399, n. 6737, p. 697–700, 17 jun. 1999.
- JULIUS, D. TRP Channels and Pain. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 29, n. 1, p. 355–384, 6 out. 2013.
- JUNG, J. et al. Agonist Recognition Sites in the Cytosolic Tails of Vanilloid Receptor 1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 46, p. 44448–44454, 15 nov. 2002.
- KAYAL, R. A. The Role of Osteoimmunology in Periodontal Disease. v. 2013, 2013.
- KEEN, P. et al. Biosynthesis, axonal transport and turnover of neuronal substance P. **Ciba Foundation symposium**, n. 91, p. 145–64, 1982.
- KIEFFER, B. L. et al. The delta-opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 24, p. 12048–52, 15 dez. 1992.
- KRAUS, J. et al. Regulation of  $\mu$ -Opioid Receptor Gene Transcription by Interleukin-4 and Influence of an Allelic Variation within a STAT6 Transcription Factor Binding Site. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 47, p. 43901–43908, 23 nov. 2001.
- LABUZ, D. et al. Relative contribution of peripheral versus central opioid receptors to antinociception. **Brain Research**, v. 1160, p. 30–38, jul. 2007.
- LAVIGNE, G. J.; SESSLE, B. J. The Neurobiology of Orofacial Pain and Sleep and Their Interactions. 2016.
- LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. W. [Acute pain measurement in animals. Part 1]. **Annales francaises d'anesthesie et de reanimation**, v. 20, n. 4, p. 347–65, abr. 2001a.
- LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. W. [Critical analysis of animal models of acute pain. II]. **Annales francaises d'anesthesie et de reanimation**, v. 20, n. 5, p. 452–70, maio 2001b.
- LEE, K. S. et al. Androgen receptor transcriptionally regulates  $\mu$ -opioid receptor expression in

- rat trigeminal ganglia. **Neuroscience**, v. 331, p. 52–61, set. 2016.
- LEITÃO, R. F. C. et al. Locally Applied Isosorbide Decreases Bone Resorption in Experimental Periodontitis in Rats. **Journal of Periodontology**, v. 75, n. 9, p. 1227–1232, set. 2004.
- LEVINE, J. D.; GORDON, N. C.; FIELDS, H. L. The mechanism of placebo analgesia. **Lancet (London, England)**, v. 2, n. 8091, p. 654–7, 23 set. 1978.
- LI, L.; HASAN, R.; ZHANG, X. The basal thermal sensitivity of the TRPV1 ion channel is determined by PKC $\beta$ II. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 34, n. 24, p. 8246–58, 11 jun. 2014.
- LIS, K. et al. Inhibition of TNF reduces mechanical orofacial hyperalgesia induced by Complete Freund's Adjuvant by a TRPV1-dependent mechanism in mice. **Pharmacological reports : PR**, v. 69, n. 6, p. 1380–1385, dez. 2017.
- LITTLEJOHN, G. O.; GUYMER, E. K.; NGIAN, G.-S. Is there a role for opioids in the treatment of fibromyalgia? **Pain Management**, v. 6, n. 4, p. 347–355, jul. 2016.
- LUCCARINI, P. et al. The Orofacial Formalin Test in the Mouse: A Behavioral Model for Studying Physiology and Modulation of Trigeminal Nociception. **The Journal of Pain**, v. 7, n. 12, p. 908–914, dez. 2006.
- LUNDY, F. T. et al. Changes in substance P and neurokinin A in gingival crevicular fluid in response to periodontal treatment. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 27, n. 7, p. 526–530, 2000.
- LUNDY, F. T.; LINDEN, G. J. Neuropeptides and neurogenic mechanisms in oral and periodontal inflammation. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 15, n. 2, p. 82–98, 2009.
- LUTHMAN, J. et al. Immunohistochemical study of neurochemical markers in gingiva obtained from periodontitis-affected sites. **Journal of Periodontal Research**, v. 24, n. 4, p. 267–278, 1989.
- MA, W.; QUIRION, R. Inflammatory mediators modulating the transient receptor potential vanilloid 1 receptor: therapeutic targets to treat inflammatory and neuropathic pain. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 11, n. 3, p. 307–320, 14 mar. 2007.
- MARINELLI, S. et al. Capsaicin activation of glutamatergic synaptic transmission in the rat locus coeruleus in vitro. **The Journal of physiology**, v. 543, n. Pt 2, p. 531–40, 1 set. 2002.
- MARTIN, W. R. Opioid antagonists. **Pharmacological reviews**, v. 19, n. 4, p. 463–521, dez. 1967.
- MENG, F. et al. Cloning and pharmacological characterization of a rat kappa opioid receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 21, p. 9954–8, 1 nov. 1993.
- MERRILL, R. L. Central Mechanisms of Orofacial Pain. v. 51, p. 45–59, 2007.

- MILLAN, M. J. Descending control of pain. **Progress in neurobiology**, v. 66, n. 6, p. 355–474, abr. 2002.
- MINAMI, M. et al. Cloning and expression of a cDNA for the rat kappa-opioid receptor. **FEBS letters**, v. 329, n. 3, p. 291–5, 30 ago. 1993.
- MINETT, M. S.; EIJKELKAMP, N.; WOOD, J. N. Significant Determinants of Mouse Pain Behaviour. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, p. e104458, 7 ago. 2014.
- MIRANDA-RIUS, J.; BRUNET-LLOBET, L.; LAHOR-SOLER, E. The Periodontium as a Potential Cause of Orofacial Pain: A Comprehensive Review. **The Open Dentistry Journal**, v. 12, n. 1, p. 520–528, 2018.
- MUHAMMAD ASHRAF NAZIR. Prevalence of periodontal disease, its association with systemic diseases and prevention. **International Journal of Health Sciences**, v. 1, n. 2, 2017.
- OSSIPOV, M. H. et al. Central modulation of pain Find the latest version : Review series Central modulation of pain. v. 120, n. 11, p. 3779–3787, 2010.
- OZ, H. S.; PULEO, D. A. Animal Models for Periodontal Disease. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, p. 1–8, 2011.
- Pain terms: a list with definitions and notes on usage. Recommended by the IASP Subcommittee on Taxonomy. **Pain**, v. 6, n. 3, p. 249, jun. 1979.
- PAIN Updates Clinical UPCOMING ISSUES Pain Control: a Human Right? Depression and Pain Fibromyalgia.** . [s.l: s.n.]. Disponível em: <[https://s3.amazonaws.com/rdcms-iasp/files/production/public/Content/ContentFolders/Publications2/PainClinicalUpdates/Archives/PCU03-2\\_1390265045864\\_38.pdf](https://s3.amazonaws.com/rdcms-iasp/files/production/public/Content/ContentFolders/Publications2/PainClinicalUpdates/Archives/PCU03-2_1390265045864_38.pdf)>. Acesso em: 4 maio. 2019.
- PATAPOUTIAN, A.; TATE, S.; WOOLF, C. J. Transient receptor potential channels: targeting pain at the source. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 8, n. 1, p. 55–68, jan. 2009.
- PETERSEN, P. E.; BAEHNI, P. C. Periodontal health and global public health. **Periodontology 2000**, v. 60, n. 1, p. 7–14, out. 2012.
- PIHLSTROM, B. L.; MICHALOWICZ, B. S.; JOHNSON, N. W. Periodontal diseases. **The Lancet**, v. 366, n. 9499, p. 1809–1820, 19 nov. 2005.
- QUARTU, M. et al. TRPV 1 receptor in the human trigeminal ganglion and spinal nucleus: immunohistochemical localization and comparison with the neuropeptides CGRP and SP. **Journal of Anatomy**, v. 229, n. 6, p. 755–767, 26 dez. 2016.
- RABOISSON, P.; DALLEL, R. The orofacial formalin test. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 28, n. 2, p. 219–226, 2004.
- RAMSEY, I. S.; DELLING, M.; CLAPHAM, D. E. AN INTRODUCTION TO TRP CHANNELS. **Annual Review of Physiology**, v. 68, n. 1, p. 619–647, jan. 2006.
- REN, K. An improved method for assessing mechanical allodynia in the rat. **Physiology and Behavior**, v. 67, n. 5, p. 711–716, 1999.

- RICHARDSON, J. D. Cellular Mechanisms of Neurogenic Inflammation. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 302, n. 3, p. 839–845, 1 set. 2002.
- RODRIGUES, J. A. G. et al. <b>Structural features and assessment of zymosan-induced arthritis in rat temporomandibular joint model using sulfated polysaccharide. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 36, n. 2, p. 127, 2014.
- ROOSTERMAN, D. et al. Neuronal Control of Skin Function: The Skin as a Neuroimmunoendocrine Organ. **Physiological Reviews**, v. 86, n. 4, p. 1309–1379, out. 2006.
- SCHAPPERT, S. M.; BURT, C. W. Ambulatory care visits to physician offices, hospital outpatient departments, and emergency departments: United States, 2001-02. **Vital and health statistics. Series 13, Data from the National Health Survey**, n. 159, p. 1–66, fev. 2006.
- SEMMES, J. et al. **Somatosensory changes after penetrating brain wounds in man.** Oxford, England: Harvard Univer. Press, 1960.
- SESSLE, B. J. Acute and Chronic Craniofacial Pain: Brainstem Mechanisms of Nociceptive Transmission and Neuroplasticity, and Their Clinical Correlates. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 11, n. 1, p. 57–91, 1 jan. 2000.
- SESSLE, B. J. Peripheral and central mechanisms of orofacial pain and their clinical correlates. **Minerva anesthesiologica**, v. 71, n. 4, p. 117–36, abr. 2005.
- SESSLE, B. J. Mechanisms of oral somatosensory and motor functions and their clinical correlates\*. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 33, n. 4, p. 243–261, abr. 2006.
- SESSLE, B. J. **Orofacial pain : from basic science to clinical management : the transfer of knowledge in pain research to education.** [s.l.] Quintessence Pub, 2008.
- SESSLE, B. J. Peripheral and central mechanisms of orofacial inflammatory pain. In: **International review of neurobiology.** [s.l: s.n.]. v. 97p. 179–206.
- SHENG, S. et al. Neuroprotection Against Hypoxic/Ischemic Injury:  $\delta$ -Opioid Receptors and BDNF-TrkB Pathway. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 47, n. 1, p. 302–315, 2018.
- SIEMENS, J. et al. Spider toxins activate the capsaicin receptor to produce inflammatory pain. **Nature**, v. 444, n. 7116, p. 208–212, 9 nov. 2006.
- SILVA, N. et al. Host response mechanisms in periodontal diseases. **Journal of Applied Oral Science**, v. 23, n. 3, p. 329–355, jun. 2015.
- SILVERTHORN, D. U. **Fisiologia Humana: Uma Abordagem Integrada.** [s.l.] Artmed Editora, [s.d.].
- SOUSA, L. H. et al. Effects of atorvastatin on periodontitis of rats subjected to glucocorticoid-induced osteoporosis. **Journal of Periodontology**, v. 87, n. 10, 2016.
- STAROWICZ, K. et al. Tonic Endovanilloid Facilitation of Glutamate Release in Brainstem

- Descending Antinociceptive Pathways. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 50, p. 13739–13749, 12 dez. 2007.
- STRUILLLOU, X. et al. Experimental animal models in periodontology: a review. **The open dentistry journal**, v. 4, p. 37–47, 29 abr. 2010.
- SUZUKI, T. et al. CXCR4 signaling in macrophages contributes to periodontal mechanical hypersensitivity in *Porphyromonas gingivalis* -induced periodontitis in mice . **Molecular Pain**, v. 13, p. 174480691668926, 2017.
- TOMINAGA, M.; CATERINA, M. J. Thermosensation and pain. **Journal of Neurobiology**, v. 61, n. 1, p. 3–12, out. 2004.
- TOMINARI, T. et al. Polymethoxy flavonoids, nobiletin and tangeretin, prevent lipopolysaccharide-induced inflammatory bone loss in an experimental model for periodontitis. **Journal of pharmacological sciences**, v. 119, n. 4, p. 390–4, 2012.
- TRACEY, I.; BUSHNELL, M. C. How Neuroimaging Studies Have Challenged Us to Rethink: Is Chronic Pain a Disease? **The Journal of Pain**, v. 10, n. 11, p. 1113–1120, nov. 2009.
- VAN HECKE, O.; TORRANCE, N.; SMITH, B. H. Chronic pain epidemiology and its clinical relevance. **British Journal of Anaesthesia**, v. 111, n. 1, p. 13–18, 2013.
- VERRI, W. A. et al. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: Targets for analgesic drug development? **Pharmacology & Therapeutics**, v. 112, n. 1, p. 116–138, out. 2006.
- VLACHOVÁ, V. et al. Functional role of C-terminal cytoplasmic tail of rat vanilloid receptor 1. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 23, n. 4, p. 1340–50, 15 fev. 2003.
- WATASE, T. et al. Involvement of transient receptor potential vanilloid 1 channel expression in orofacial cutaneous hypersensitivity following tooth pulp inflammation. **Journal of Oral Science**, v. 60, n. 1, p. 8–13, 2018.
- WESSELDIJK, F. “Inflammatory Soup” Mediators of inflammation in CRPS. **Current Drug Therapy**, 2008.
- WICK, E. C. et al. Transient receptor potential vanilloid 1, calcitonin gene-related peptide, and substance P mediate nociception in acute pancreatitis. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 290, n. 5, p. G959–G969, maio 2006.
- WINNING, L.; LINDEN, G. J. Periodontitis and Systemic Disease: Association or Causality? **Current oral health reports**, v. 4, n. 1, p. 1–7, 2017.
- WOLLER, S. A. et al. An overview of pathways encoding nociception. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 35, n. 5, p. S40–S46, 2017.
- XING, J.; LI, J. TRPV1 Receptor Mediates Glutamatergic Synaptic Input to Dorsolateral Periaqueductal Gray (dl-PAG) Neurons. **Journal of Neurophysiology**, v. 97, n. 1, p.

503–511, jan. 2007.

YANG, H. et al. Increased Expression of Glutaminase in Osteoblasts Promotes Macrophage Recruitment in Periapical Lesions. **Journal of Endodontics**, v. 43, n. 4, p. 602–608, 2017.

ZHANG, X. et al. Sex differences in mu opioid receptor expression in trigeminal ganglia under a myositis condition in rats. **Eur J Pain**, v. 18, n. 2, p. 151–161, 2014.

ZHANG, X. Molecular sensors and modulators of thermoreception. **Channels (Austin, Tex.)**, v. 9, n. 2, p. 73–81, 2015.

ZOLLNER, C. et al. Painful Inflammation-Induced Increase in  $\mu$ -Opioid Receptor Binding and G-Protein Coupling in Primary Afferent Neurons. **Molecular Pharmacology**, v. 64, n. 2, p. 202–210, 1 ago. 2003.

## ANEXO A – APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA NO COMITÊ DE ÉTICA PARA USO EM ANIMAIS.



Universidade Federal do Ceará – Campus Sobral  
 Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA  
 Rua: Av. Comte. Mascoteônio Rocha Pontes, 100, Derby  
 CEP: 62.042-280 Sobral-CE  
 Fone/Fax: (88) 3611.8000

### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada: **Caracterização neuroquímica das vias opióides na inibição descendente da dor em modelo da periodontite experimental em ratos**, registrada com o nº 10/17, sob a responsabilidade da Profa. Dra. **Helliada Vasconcelos Chaves** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) *Campus Sobral*, em reunião de 06/12/2017.

Finalidade	( ) Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/01/2018 ate 01/01/2020
Espécie/linhagem/raça	Ratos heterogênico <i>Wistar</i>
Nº de animais	156
Peso/Idade	180-220g/2-4 meses
Sexo	144 ♂ e 12 ♀
Origem	Biotério Central de Fortaleza

Sobral, 07 de dezembro de 2017.

Prof. Dra. Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar  
 Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA