

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISIOLOGIA

**ABORDAGENS FARMACOLÓGICA E NÃO FARMACOLÓGICA EM MODELO DE  
DOR CRÔNICA OROFACIAL: AVALIAÇÕES COMPORTAMENTAIS E  
NEUROQUÍMICAS**

VANESSA LEAL SCARABELOT

Porto Alegre

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISILOGIA

**ABORDAGENS FARMACOLÓGICA E NÃO FARMACOLÓGICA EM MODELO DE  
DOR CRÔNICA OROFACIAL: AVALIAÇÕES COMPORTAMENTAIS E  
NEUROQUÍMICAS**

VANESSA LEAL SCARABELOT

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia como parte dos requisitos obrigatórios para obtenção do título de Doutor em Fisiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Iraci Lucena da Silva Torres

Porto Alegre

2015

*O sucesso nasce do querer, da determinação e da persistência  
em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo,  
quem busca e vence obstáculos, no mínimo, fará coisas admiráveis.*

José de Alencar

*Aos meus Pais*

## AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Profa. Dra. Iraci Lucena da Silva Torres, que me aceitou como sua orientanda há oito anos e desde então tem oferecido todo empenho e incentivo para meu crescimento profissional e pessoal. Obrigada Prof. Iraci por ser esta profissional inspiradora e esta pessoa que tem o dom de reconhecer e acreditar no melhor de cada um. A sua dedicação foi fundamental para que eu chegasse até aqui.

Ao meu Pai, Ivonei, e minha Mãe, Claudet, por terem acreditado nos meus sonhos quando até eu mesma os questionava. Obrigada por todos os ensinamentos, pelo carinho e pela compreensão das minhas ausências. Obrigado por estarem comigo em todos os momentos com muito amor, paciência e incentivo.

Aos meus irmãos, Welinton e Wagner, agradeço a compreensão, a paciência e a alegria que trazem a minha vida. Que possamos continuar crescendo juntos sem perder a admiração que temos uns pelos outros.

Um agradecimento especial à estimada colega e excelente pesquisadora Dra. Liciane Fernandes Medeiros pela disposição em ajudar sempre que preciso, por ter sido paciente e solícita desde meus primeiros passos na pós-graduação até a conclusão desta tese.

À querida colega Carla de Oliveira que esteve presente durante os meus quatro anos de doutorado sempre com uma palavra amiga e incentivadora. Obrigada por confiar em mim, quando eu mesma tinha tantas dúvidas. A tua amizade traz muita alegria para minha vida.

Agradeço às prezadas colegas Lauren Naomi Spezia Adachi e Stefania Giotti Cioato que foram incansáveis durante os experimentos. Obrigada por me incentivarem, por compartilharem seus conhecimentos comigo e por fazerem os dias de trabalho mais alegres.

À colega Isabel Cristina de Macedo por incentivar todo o grupo a buscar incessantemente o conhecimento, pela sua força de vontade e por seu amor à Fisiologia e à pesquisa.

Aos queridos colegas Dra. Jozi Godoy Figueiredo e Dr. Rafael Vercelino por compartilharem suas experiências comigo e estarem sempre prontos a ajudar com disposição e alegria.

Às colegas Dra. Andressa de Souza e Joanna Ripoll Rozisky por terem me acolhido no grupo de pesquisa e trocado tantas experiências enriquecedoras comigo.

Ao Paulo Ricardo Marques Filho e a todos os colegas que passaram pelo grupo pesquisa em Farmacologia da Dor e Neuromodulação: Pesquisas Pré-Clínicas, por terem contribuído para meu crescimento e para a conclusão deste trabalho, o meu sincero agradecimento.

Aos professores Wolnei Caumo, Maria Flávia Marques Ribeiro e Alex Sander Araújo por serem exemplos de comprometimento com sua profissão. Ambos foram muito importantes para minha formação na pós-graduação.

À professora Ana Helena Paz pela disposição em cooperar com este trabalho.

A todos os profissionais da Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em especial à Marta Cioato, Fabíola Schons Meyer e Rosalina Braga por todo suporte para o desenvolvimento deste estudo. A contribuição de vocês enriquece de maneira significativa a pesquisa científica desenvolvida nesta instituição.

Ao Everaldo B. de Almeida (Centro de Pesquisa Experimental – HCPA) e Jeferson B. da Silva (Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas – HCPA) pela generosidade e disposição em ajudar sempre que necessário.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia pela oportunidade de desenvolver meu Doutorado nesta instituição.

Aos funcionários do PPGFisio, Diego Coelho da Motta e Vanessa Abreu de Menezes pela disposição em ajudar sempre que solicitados.

Ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG/HCPA) pelo apoio financeiro para desenvolvimento deste estudo (12-0104).

Ao CNPq por ter financiado meus estudos.

E, sobretudo, agradeço à Universidade Federal do Rio Grande do Sul onde completo 10 anos de muito aprendizado entre graduação e pós-graduação. Reitero toda a minha gratidão e meu orgulho de ter realizado minha formação profissional nesta instituição.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	ix
LISTA DE TABELAS .....	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
RESUMO .....	xii
ABSTRACT .....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Dor Crônica.....	2
1.2 Dor crônica orofacial .....	7
1.3 Sistema Sensorial Trigeminal .....	9
1.4 Tratamento farmacológico das DTMs .....	10
1.5 Tratamento não-farmacológico das DTMs .....	14
2 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO.....	17
3 HIPÓTESES .....	19
3.1 Hipótese 1 .....	20
3.2 Hipótese 2 .....	20
4 OBJETIVOS.....	21
4.1 Objetivo Geral.....	22
4.2 Objetivos Específicos .....	22
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
5.1 Local da Pesquisa.....	24
5.2 Animais.....	24
5.3 Modelo de Dor Orofacial .....	25
5.4 Testes Comportamentais.....	25
5.4.1 Hiperalgesia Mecânica (von Frey facial) .....	25
5.4.2 Hiperalgesia térmica (Teste da Placa quente) .....	26
5.5 Protocolos Experimentais .....	27
5.5.1 Protocolo 1 .....	27
5.5.1.1 Delineamento .....	27
5.5.1.2 Desenho Experimental .....	27

5.5.1.3 Tratamento com Estimulação Transcraniana por Corrente Contínua (ETCC) .....	28
5.5.1.4 Grupos Experimentais .....	29
5.5.2 Protocolo 2 .....	30
5.5.2.1 Delineamento .....	30
5.5.2.2 Desenho Experimental .....	30
5.5.2.3 Tratamento com Melatonina .....	31
5.5.2.4 Grupos Experimentais .....	31
5.6 Eutanásia dos Animais e Preparação das Amostras.....	32
5.7 Análise Histológica Referente ao Protocolo 1 .....	33
5.8 Dosagens Bioquímicas.....	33
5.9 Análise estatística .....	33
5.9.1 Análise Estatística Protocolo 1.....	34
5.9.2 Análise Estatística Protocolo 2.....	34
6 RESULTADOS .....	35
6.1 Protocolo 1 .....	36
6.1.1 Comportamento Nociceptivo .....	36
6.1.1.1 Hiperalgisia Mecânica (Teste de Von Frey Facial).....	36
6.1.1.2 Hiperalgisia Térmica .....	37
6.1.2 Análises Bioquímicas.....	39
6.1.2.1 Níveis de BDNF.....	39
6.1.2.2 Níveis de NGF.....	40
6.1.2.3 Níveis de IL-10.....	41
6.1.2.4 Níveis de IL-6.....	42
6.1.3 Análise Histológica .....	42
6.2 Protocolo 2.....	44
6.2.1 Comportamento Nociceptivo .....	44
6.2.1.1 Hiperalgisia Mecânica (Teste de von Frey Facial).....	44
6.2.1.2 Hiperalgisia Térmica (Teste da Placa Quente).....	45
6.2.2 Análises Bioquímicas.....	46
6.2.2.1 Níveis de BDNF.....	46
6.2.2.2 Níveis de NGF.....	47



6.2.2.3 Níveis de IL-6.....	48
6.2.2.4 Níveis de IL-10.....	49
7 DISCUSSÃO.....	51
7.1 Discussão Protocolo 1.....	52
7.2 Discussão Protocolo 2.....	56
8 CONCLUSÕES.....	62
9 PERSPECTIVAS.....	64
10 REFERÊNCIAS.....	66
ANEXOS.....	82
ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética.....	83
ANEXO B – Divulgações.....	84
ANEXO C - Artigos publicados no período do Doutorado.....	87
ANEXO D – Artigo 1 submetido ao periódico Pain Medicine.....	90
ANEXO E – Artigo 2 a ser submetido ao periódico European Journal of Pharmacology.....	124

**LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 1.</b> Vias aferentes nociceptivas.....	5
<b>Figura 2.</b> Efeito modulatório da ETCC em diferentes regiões do SNC .....	16
<b>Figura 3.</b> Teste de von Frey facial.....	26
<b>Figura 4.</b> Teste da Placa Quente .....	27
<b>Figura 5:</b> Desenho experimental do protocolo 1 .....	28
<b>Figura 6:</b> Posicionamento dos eletrodos sobre o escalpo para o tratamento com ETCC.....	29
<b>Figura 7:</b> Desenho experimental do protocolo 2 .....	31
<b>Figura 8:</b> Efeito da ETCC na resposta hiperalgésica mecânica .....	37
<b>Figura 9:</b> Efeito da ETCC na hiperalgesia térmica .....	38
<b>Figura 10:</b> Níveis de BDNF .....	39
<b>Figura 11:</b> Níveis de NGF .....	40
<b>Figura 12:</b> Níveis de IL-10.....	41
<b>Figura 13:</b> Níveis de IL-6.....	42
<b>Figura 14:</b> Análise histológica da ATM.....	43
<b>Figura 15:</b> Efeito da melatonina na resposta hiperalgésica mecânica.....	45
<b>Figura 16:</b> Efeito da melatonina na resposta hiperalgésica térmica .....	46
<b>Figura 17:</b> Níveis de BDNF em tronco encefálico.....	47
<b>Figura 18:</b> Níveis de NGF em tronco encefálico.....	48
<b>Figura 19:</b> Níveis de IL-6 em tronco encefálico .....	49
<b>Figura 20:</b> Níveis de IL-10 em tronco encefálico .....	50

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1:</b> Escores histológicos.....	44
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

AINE – anti-inflamatório não esteroideal

AMPA -  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico

BDNF – *brain derived neurotrophic fator* (fator neurotrófico derivado do cérebro)

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CFA – *complete Freund's adjuvante* (adjuvante completo de Freund)

CGRP – peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

COX-2 – cicloxigenase 2

DLPFC – *dorsolateral prefrontal córtex* (córtex pré-frontal dorsolateral)

DTM – disfunção temporomandibular

ETCC – estimulação transcraniana por corrente contínua

GABA - Ácido gama-aminobutírico

GPPG – Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação

HCPA – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

IASP – *International Association for Study of Pain* (Associação Internacional para Estudos da Dor)

IL- interleucinas

LTP – *long term potentiation* (potenciação de longa duração)

M1- córtex motor primário

NF- $\kappa$ B – fator nuclear kappa B

NGF – *nerve growth factor* (fator de crescimento neuronal)

NMDA – N-metil-d-aspartato

PG – prostaglandinas

rTMS - *repetitive transcranial magnetic stimulation* (estimulação magnética transcraniana repetitiva)

SNC – sistema nervoso central

SP – substância P

tDCS – *transcranial direct current stimulation*

TrkA – receptor tirosina quinase B

TrkB – receptor tirosina quinase B

UAMP – Unidade Análise Molecular e Proteínas

UEA – Unidade de Experimentação Animal

## RESUMO

Dores crônicas representam um problema de saúde pública significativo. Suas consequências são devastadoras para a qualidade de vida dos pacientes e acarretam um custo alto para sociedade e para o sistema de saúde. A dor orofacial é uma condição de dor associada à cabeça, face, pescoço e estruturas da cavidade bucal. Entre os quadros mais comuns de dor crônica orofacial estão as disfunções temporomandibulares (DTMs) que incluem alterações musculoesqueléticas e neuromusculares envolvendo a articulação temporomandibular (ATM), musculatura mastigatória e todos os tecidos associados. Em geral, as DTMs apresentam um componente inflamatório que é um dos principais causadores de dor nestes quadros. Citocinas como as interleucinas (IL-1, IL-6 e IL-8) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) participam deste processo e exercem um papel significativo na doença degenerativa articular. Por outro lado, citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10, podem reduzir a resposta hiperalgésica e alterar a transcrição de interleucinas pró-inflamatórias como a IL-1 $\beta$ . O principal objetivo dos tratamentos para DTMs é o controle da dor articular, a recuperação da função do sistema mastigatório e a reeducação do paciente para minimizar cargas que possam perpetuar o problema. As opções medicamentosas existentes para o tratamento da dor crônica orofacial trazem algum benefício, no entanto são relacionadas a importantes efeitos colaterais. Estes efeitos suscitam a busca de novas alternativas terapêuticas para o alívio da dor nestes pacientes. Neste contexto, surgem novas opções como a Estimulação Transcraniana por Corrente Contínua (ETCC) e a melatonina. A ETCC é uma técnica de neuromodulação central, não invasiva, que representa uma opção promissora no manejo da dor, pois promove alterações neuroplásticas nas vias envolvidas com o processo doloroso e pode ser combinada a outras terapias. Por outro lado, a melatonina, um neuro-hormônio com marcante papel cronobiológico, apresenta também outras propriedades farmacológicas como anti-inflamatória e analgésica que vem despertando interesse de pesquisadores. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de duas novas opções terapêuticas, uma não-farmacológica (ETCC) e uma farmacológica (Melatonina), sobre a resposta hiperalgésica mecânica e térmica em ratos submetidos a um modelo de dor crônica orofacial (DTM). O estudo envolveu um modelo de DTM induzido por meio da injeção intrarticular de adjuvante completo de Freund. Além disso, nós observamos o impacto destes tratamentos sobre os níveis de citocinas (IL-6 e IL-10) e fatores neurotróficos (BDNF, NGF) em tronco encefálico e soro. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (GPPG-HCPA protocolo número: 12-0104) e CEUA/UFRGS (protocolo número 22356). Para avaliação da resposta hiperalgésica mecânica e térmica foram utilizados os testes de von Frey facial e placa quente, respectivamente. Os níveis de BDNF, NGF, IL-6 e IL-10 foram avaliados pelo método de ELISA. Nossos resultados demonstraram que tanto a ETCC, quanto a melatonina foram capazes de reduzir a resposta hiperalgésica induzida pelo modelo de dor. Nos animais tratados com ETCC houve interação dos fatores independentes (dor e tratamento) que levou à modificação nos níveis centrais dos mediadores avaliados, sugerindo que o efeito da ETCC envolve alterações plásticas nas vias envolvidas com o processamento da dor. Quanto ao tratamento com melatonina, embora tenha sido observado efeito da sua administração sobre a resposta nociceptiva, não foi possível afirmar o seu impacto sobre os níveis de citocinas e fatores neurotróficos devido à influência do veículo utilizado para preparação da melatonina.

## ABSTRACT

Chronic pain represents a significant public health problem. Its consequences are devastating to the patient's life quality and carry a high cost to society and the health system. The orofacial pain is a pain condition associated with the head, face, neck and structures of the oral cavity. One of the most common type of orofacial pain is the temporomandibular disorders (TMDs) that include musculoskeletal and neuromuscular alterations involving temporomandibular joint (TMJ), and masticatory muscles. TMD has an inflammatory component that is a major cause of pain. Cytokines such as interleukins (IL-1, IL-6 and IL-8) and tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) are involved in this process and exert an important role in degenerative joint disease. Moreover, anti-inflammatory cytokines such as IL-10 can reduce the hyperalgesic response and modify the pro-inflammatory interleukins transcription such as IL-1 $\beta$  in an orofacial pain model in rats. The main objective of DTMs treatment is the joint pain control, the recovery of the masticatory system function and re-educate the patient to minimize adverse loads that could perpetuate the problem. The pharmacological treatments for TMD include non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), and steroids immunosuppressants. The discovery of new drugs or non-pharmacological treatments, which are safer, seems necessary, due to lack of effectivity and side effects with use of standard therapies. In this context, appears new therapeutics options as Transcranial Direct Current Stimulation (tDCS) and melatonin. The tDCS is a central neuromodulation technique, noninvasive, which represents a promising option in pain management because it promotes neuroplastic changes in pathways involved in the painful process and can be combined with other therapies. On the other hand, melatonin, a neuro hormone with remarkable chronobiological role also presents pharmacological properties that have been attracted the researchers interest for its sedative activity, anxiolytic, antidepressant, antioxidant, anti-inflammatory and analgesic. Thus, the aim of this study was to evaluate the effect of two new treatment options, a non-pharmacological (tDCS) and a pharmacological (Melatonin), upon the hyperalgesic mechanical and thermal response in rats subjected to a model of orofacial chronic pain (TMD) induced by complete Freund's adjuvant. Furthermore, we observed the impact of these treatments upon central neuroimmunomodulators levels (BDNF, NGF, IL-6 and IL-10). This study was approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA GPPG - protocol number: 12-0104) and CEUA/UFRGS (protocol number 22356). To evaluate the mechanical and thermal hyperalgesic response we used the von Frey test facial and hot plate, respectively. The BDNF, NGF, IL-6 and IL-10 levels were assessed by ELISA method. Our results showed that both tDCS and melatonin was able to reduce the hyperalgesic responses induced pain model. In animals treated with tDCS there was interaction of the independent factors (pain and treatment) leading to change in the central levels of the evaluated cytokines and neuromodulators, suggesting that the effect of tDCS involves plastic changes in pain pathways. In relation to melatonin treatment, although it was observed effect upon the nociceptive response, it was not possible evaluate the impact of melatonin on cytokines and neuromodulators levels due to the influence of the vehicle used for melatonin preparation.

## **1. INTRODUÇÃO**

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Dor Crônica

A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) define dor como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a dano tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de tal dano” (Merskey e Bogduk, 1994). Do ponto de vista temporal, podemos classificar em dois tipos de dor: aguda e crônica. A aguda, que dura segundos, dias ou semanas, geralmente ocorre como sinal de alerta de lesão tecidual, denunciando um estado de urgência ou emergência do organismo. A dor crônica ou persistente pode durar meses ou anos, estar ou não associada à lesão concomitante e perde sua propriedade de alerta desencadeando prejuízos ao paciente, deixando de ser um sintoma passando a ser uma doença (Schaible, 2007).

A dor crônica pode ser decorrente tanto de alterações no sistema aferente de transmissão e percepção da dor, quanto no sistema eferente de inibição. O tratamento da dor crônica apresenta-se como um grande desafio aos profissionais da saúde, devido às dificuldades e limitações das terapêuticas existentes. A Associação Americana de Anestesiologia, em 2010, definiu dor crônica como “dor de qualquer etiologia, não diretamente relacionada com comprometimento neoplásico, associada a uma condição médica crônica ou estendendo-se, em duração, além do limite temporal esperado de lesão tecidual e cicatrização normal, afetando adversamente a função ou o bem-estar do indivíduo”.

Esta patologia representa um problema de saúde pública significativo, de custo elevado e devastador para a qualidade de vida dos pacientes, acarretando um custo alto para sociedade e para o sistema de saúde (Blyth, 2008). A Organização Mundial da Saúde afirma que, anualmente, 1 em cada 10 pessoas recebem o diagnóstico de dor crônica tanto em países desenvolvidos quanto em



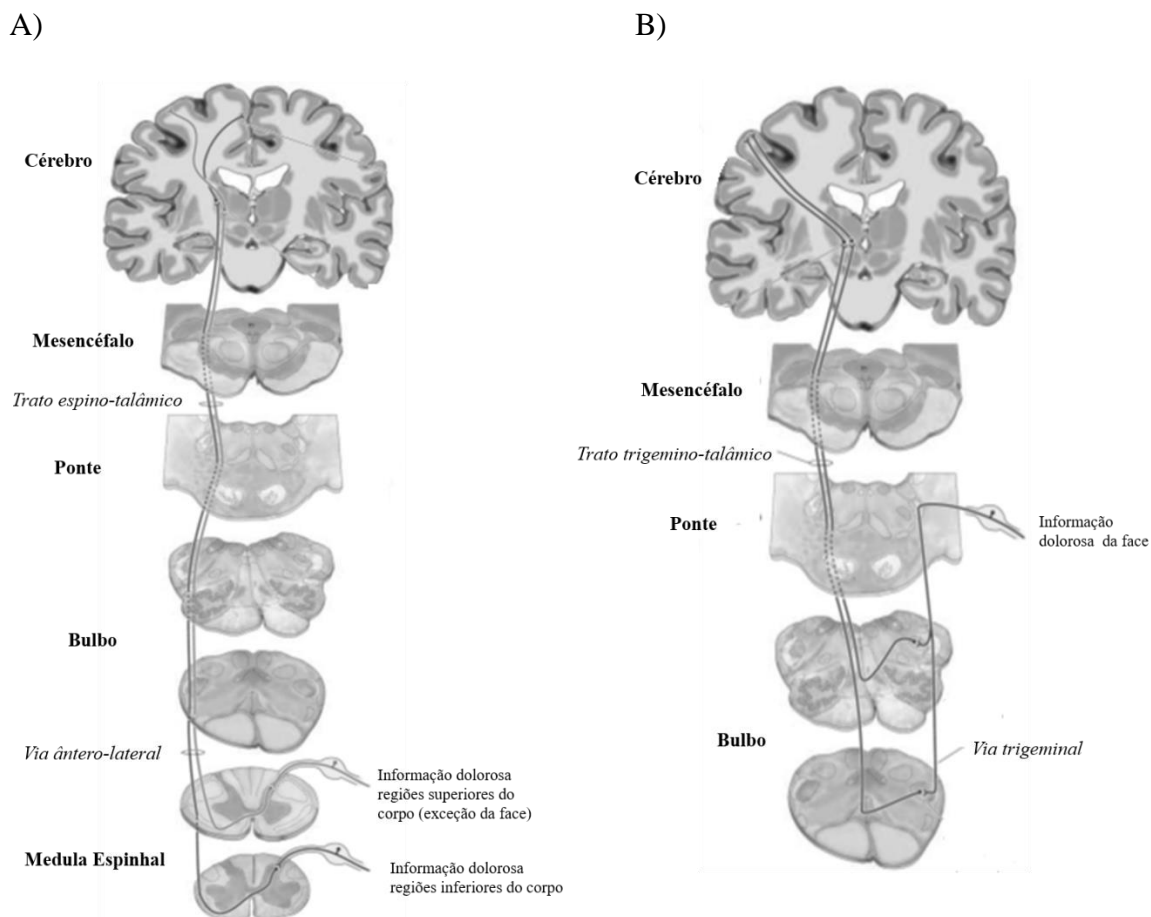
desenvolvimento (Goldberg e McGee, 2011). Na Europa, a dor crônica é a mais frequente causa de limitação em pessoas com menos de 45 anos e o segundo motivo mais frequente de consulta médica. Nos EUA, é causa de perda de 1400 dias de trabalho por mil habitantes ao ano (Garcia e Neto, 2011). No Brasil, um estudo verificou que entre pacientes com dor crônica, 94,9% apresentava comprometimento da atividade profissional (Garcia et al., 2013).

Existem dois tipos de dor crônica: a dor crônica nociceptiva, que ocorre por ativação duradoura de nociceptores, como em doenças inflamatórias crônicas; e a dor crônica neuropática que é caracterizada por dor espontânea sem qualquer estímulo aparente (Riedel e Neeck, 2001; Schaible, 2007;). A IASP define dor neuropática como dor causada ou iniciada por uma lesão primária ou disfunção no sistema nervoso (Merskey e Bogduk, 1994). Novos conceitos têm sido agregados a esta definição descrevendo a dor neuropática como uma plasticidade mal adaptativa causada por lesão ou doença que afeta o sistema somatossensorial, altera o processamento da sinalização nociceptiva, gerando resposta exacerbada a estímulos nocivos e resposta a estímulos inócuos (Costigam, 2009).

A transdução dos estímulos dolorosos depende da ativação de receptores sensoriais especializados – nociceptores – que são terminações nervosas livres das fibras C e A $\delta$ . Os nociceptores são ativados quando um estímulo atinge o limiar nocivo (Schaible, 2007) e a resposta pode aumentar progressivamente de acordo com a intensidade do estímulo, se a estimulação for contínua, pode ocorrer diminuição do limiar de resposta destes nociceptores, fenômeno conhecido como sensibilização (Riedel e Neeck, 2001; Schaible, 2007).

A sensibilização pode ser periférica ou central (Basbaum et al., 2009; Costigam et al., 2009). Na periferia, após uma lesão tecidual, desencadeia-se um processo inflamatório agudo que é seguido por reparação tecidual ou por cronificação deste processo. O acúmulo de mediadores locais atua sobre os nociceptores resultando em exacerbção da resposta ao estímulo (Woolf,

1989). A bradicinina e a substância P promovem intensa vasodilatação que aumenta a permeabilidade vascular e conseqüentemente aumenta a resposta inflamatória. As prostaglandinas, sintetizadas a partir de fosfolipídeos de membrana das células lesadas, promovem diminuição do limiar de excitabilidade dos nociceptores, tornando-os responsivos a estímulos de menor intensidade (Carvalho e Lemonica, 1998). A sensibilização periférica (local) induz um reflexo axônico que resulta em liberação de substância P, neurocinina A e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP). As fibras A $\delta$ , mielinizadas, e as fibras C, não mielinizadas, são axônios de neurônios aferentes primários chamados de neurônios de primeira ordem e conduzem a informação até o sistema nervoso central (SNC) (Riedel e Neeck, 2001; Schaible, 2007). Cada neurônio apresenta um axônio que bifurca-se emitindo um ramo para a região periférica e um para o sistema nervoso central, onde fazem sinapse com neurônios de segunda ordem, originando as vias ascendentes de condução da dor (Basbaum e Jessell, 2000) (Figura 1).



**Figura 1. Vias aferentes nociceptivas. (A) Sistema espinho-talâmico (B) Sistema trigemino-talâmico.** Adaptado de Purves, 2004.

No SNC o processo de sensibilização é mediado, sobretudo, pelo aminoácido excitatório glutamato, por meio da ativação de seus receptores do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) e não NMDA. A sensibilização central pode resultar de processos independentes (sensibilização sináptica clássica, *wind up* e potenciação de longa duração – LTP) (Ji et al., 2003). A sensibilização sináptica clássica está relacionada aos estímulos periféricos que aumentam a resposta das fibras A $\delta$  e C (potenciação homossináptica) e fibras A $\beta$  (potenciação heterossináptica). O *wind up* resulta da estimulação aferente repetida de baixa frequência (inferior a 5 Hz) por tempo prolongado com liberação de neurotransmissores excitatórios, sobretudo glutamato, no corno dorsal da medula

espinhal. O glutamato liga-se a receptores NMDA resultando em influxo de cálcio e ativação da proteína cinase C, que modifica estruturalmente o canal de NMDA, aumentando sua sensibilidade ao glutamato e a resposta à dor frente a estímulos repetidos de mesma intensidade (Schaible, 2007). A potenciação de longa duração (do inglês *Long Term Potentiation* - LTP) torna mais eficiente a transmissão sináptica (Zhuo, 2009) e está relacionada a estímulos repetidos de alta frequência com posterior ativação de receptores ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico (AMPA) e de neurocinina (NK)-1 (Randic et al., 1993).

Depois da integração na medula espinhal, a informação nociceptiva é transferida para o tálamo e posteriormente até o córtex somatossensorial. Em cada nível do SNC há mecanismos modulatórios que sensibilizam ou suprimem a nocicepção em todas as etapas em que ela é processada. Nos diversos estágios das vias de dor, diferentes sistemas de controle modulam, constantemente, tanto de maneira ascendente quanto descendente, a transmissão da informação nociceptiva (Woolf, 2011). Os receptores NMDA e opioides fazem parte dos dois sistemas mais importantes na modulação da nocicepção e antinocicepção e estão distribuídos em praticamente todas as regiões do SNC (Riedel e Neeck, 2001).

Um importante fator nos processos neuromodulatórios é a presença de neurotrofinas como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF). O BDNF é uma neurotrofina moduladora da neurotransmissão sensorial das vias nociceptivas em nível espinhal e supra espinhal (Merighi et al., 2008). Além disso, o BDNF medeia a potenciação de receptores NMDA que estão envolvidos nos processos de facilitação na medula espinhal (Ren e Dubner, 2007).

A dor inflamatória crônica é, portanto, relacionada à hiperexcitabilidade de neurônios do corno dorsal da medula espinhal decorrente de menor limiar de ativação, o que induz a despolarização espontânea e amplifica seus campos receptivos.

## 1.2 Dor crônica orofacial

A dor orofacial é uma condição de dor associada à cabeça, face, pescoço e estruturas da cavidade oral. Diferentes fatores podem estar relacionados ao aparecimento de dores faciais como trauma, disfunções temporomandibulares, neuralgias, cefaleias, sinusites e dores miogênicas (Okeson, 2005). O tratamento ideal para estes quadros envolve uma equipe multidisciplinar de profissionais entre eles dentistas, médicos, fisioterapeutas e psicólogos. A dor na região facial, em especial em boca, pode ser muito angustiante para o paciente devido ao contexto psicológico e emocional desta área do corpo (Cesa, 2008).

Entre os diferentes quadros de dor orofacial estão as disfunções temporomandibulares (DTMs) que são a principal causa de dores orofaciais de origem não dental (Okeson, 2005). As DTMs incluem alterações musculoesqueléticas e neuromusculares que envolvem a articulação temporomandibular (ATM), musculatura mastigatória e todos os tecidos associados (Greene, 2010). São condições multifatoriais e apresentam como sintomatologia mais comum a dor nos músculos mastigatórios e articulação (ATM), limitação e estalidos no movimento de abertura e fechamento bucal (Graff-Radford e Bassiur, 2014). A maior prevalência de DTM é encontrada em jovens e adultos de meia idade, entre 20 a 40 anos (Rodrigues e Gouveia, 2014).

Em geral, as DTMs apresentam um componente inflamatório, porém há poucos estudos avaliando o processo inflamatório nas ATMs se compararmos ao número de estudos envolvendo outras articulações sinoviais (Hutchins et al., 2000). No entanto, a maior parte dos mecanismos propostos para as demais articulações sinoviais é comum aos processos inflamatórios em ATM. Particularidades anatômicas das ATMs podem influenciar sua resposta como articulação sinovial. A superfície da ATM é coberta por tecido fibroso denso enquanto outras articulações são cobertas com cartilagem hialina (Tominaga et al., 1999). Estudos utilizando adjuvante para indução de

poliartrite em ratos mostram uma inflamação menos severa na ATM em relação à articulação do joelho (Tominaga et al., 1999).

Inflamação intra-articular é uma das principais causas de dor nos transtornos temporomandibulares (Yamasaki et al., 2008). A inflamação pode ocorrer na sinóvia (sinovite) na cápsula articular (capsulite) e/ou nos tecidos retrodiscais (retrodiscite). Em geral, ocorre em resposta a trauma, infecção ou degeneração dos componentes da articulação, ou consequência de doenças sistêmicas como artrite reumatoide (Tanaka, Detamore e Mercuri, 2008).

Citocinas como as interleucinas (IL-1, IL-6 e IL-8) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) exercem um papel significativo na doença degenerativa articular, aumentando a degradação de colágeno, afetando a condrogênese e a remodelação articular (Sessle, 2005). Sintomas como dor e hiperalgesia estão relacionados ao aumento na expressão de IL-1 $\beta$ . A presença desta citocina no líquido sinovial da ATM indica a presença de lesão, uma vez que não é encontrada no líquido sinovial de ATM normal (Alstergren, 2000). O TNF- $\alpha$  participa das fases iniciais do processo inflamatório e da indução de outros mediadores inflamatórios como IL-1, IL-6 e Prostaglandinas (PG). Estes mediadores além de sensibilizarem nociceptores levam a destruição da cartilagem e de tecido ósseo (Fredriksson, Alstergren e Kopp, 2006). A serotonina participa do processo de dor espontânea, hiperalgesia e alodinia, assim como os neuropeptídeos substância P (SP), CGRP e neuropeptídeo Y confirmando a participação do sistema nervoso no processo inflamatório da ATM (Fredriksson, Alstergren e Kopp, 2005).

Por outro lado, citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10, exercem um papel fundamental em processos de dor. Shimizu e colaboradores (2009) observaram que a injeção IL-10 em sítios do tronco encefálico relacionados ao processamento da dor orofacial, produziu anti-hiperalgesia e inibição da transcrição da IL-1 $\beta$  em um modelo de dor orofacial em ratos.

A utilização de modelos animais permite o estudo de processos inflamatórios na ATM, para tanto utiliza-se a injeção intra-articular de Adjuvante Completo de Freund (CFA), óleo de mostarda, de formalina, entre outros (Roveroni et al., 2001; Spears et al., 2005). No entanto, para indução de inflamação crônica, destaca-se o CFA por sua capacidade de produzir inflamação e resposta nociceptiva de longa duração. Estudos prévios com CFA e DTM demonstraram níveis elevados de CGRP, fator de crescimento neural (NGF), interleucina-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  no sítio inflamado até seis semanas após a administração de CFA em ratos (Spears et al., 2005; Nascimento e Leite-Panissi, 2014).

Considerando que a dor decorrente de processo inflamatório na ATM é associada com dor tecidual profunda que é referida para a pele é possível avaliar a hiperalgesia induzida por CFA na pele facial sem necessitar de manipulação invasiva (Imbe et al., 2001).

### **1.3 Sistema Sensorial Trigeminal**

Os tecidos da porção anterior da face, incluindo estruturas intrabucais, são inervados predominantemente por ramificações do quinto par craniano (V), o nervo trigêmeo (Dubner, 1978; Sessle, 2005). Três subdivisões deste nervo emergem do gânglio trigeminal: o ramo oftálmico (V1), o ramo maxilar (V2) e o ramo mandibular (V3). Os ramos V1 e V2 são unicamente sensitivos enquanto o ramo V3 é considerado um nervo misto por apresentar uma porção motora e uma sensitiva. V1 e V2 são responsáveis pela sensibilidade dos terços superior e médio da face, respectivamente. O ramo V3 supre as aferências sensoriais do terço inferior da face e ATM e provê eferências motoras que inervam principalmente os músculos da mastigação. Os corpos celulares dos neurônios que compõem o nervo trigêmeo encontram-se no gânglio trigeminal. Os impulsos aferentes das fibras trigeminais (C, A $\delta$  e A $\beta$ ), transitam pela periferia, através do gânglio trigeminal

e da raiz do trigêmeo, entram no SNC na altura da ponte e descem através do trato trigeminal para entrar no núcleo trigeminal (Miles, Nauntofte e Svensson, 2004). O núcleo trigeminal subdivide-se em subnúcleo oral superior, subnúcleo interpolar médio e, subnúcleo caudal onde ocorre a maioria das sinapses das fibras de dor (Sessle, 2005). Grande parte das fibras C e A $\delta$  projetam-se para as lâminas I, II, V e VI do subnúcleo caudal, que também é o local de maior concentração de mediadores químicos (glutamato, substância P) e de receptores envolvidos com a transmissão nociceptiva, bem como moduladores destas informações (serotonina, encefalina, ácido gama aminobutírico - GABA) (Sessle, 2005).

#### **1.4 Tratamento farmacológico das DTMs**

Inicialmente, o objetivo dos tratamentos para DTMs é o controle da dor articular, a recuperação da função do sistema mastigatório e a reeducação do paciente para minimizar cargas que possam perpetuar o problema (Peimani e Sardary, 2014). O tratamento clínico é o de primeira escolha e muitas vezes incluem o uso de dispositivos interoclusais. No entanto, muitos pacientes permanecem com queixa de dor, tornando-se necessária a combinação de terapias farmacológica, odontológica, fisioterápica e em alguns casos fonoaudiológica e cirúrgica, para o alívio da dor: (Melo, 2011). Entre os tratamentos farmacológicos das DTMs estão os anti-inflamatórios esteroidais e não esteroidais (AINEs), analgésicos opioides, relaxantes musculares, ansiolíticos e antidepressivos (Peimani e Sardary, 2014).

Os AINEs apresentam respostas positivas principalmente nos quadros dolorosos que apresentam componente inflamatório e intensidade de dor de leve a moderada (DosSantos, 1995). Os anti-inflamatórios esteroidais são pouco utilizados de forma sistêmica no tratamento das DTMs devido aos extensos efeitos colaterais (Okeson, 2000). Por outro lado, a injeção de esteroides na ATM é recomendada em casos de dor severa na articulação, em que não há resposta com AINEs



(Melo, 2011). Analgésicos opioides estão indicados em quadros de dor moderada ou intensa, no entanto, efeitos colaterais como náuseas, constipação, sedação, dependência, tolerância e depressão respiratória, limitam seu uso (Sobreira e Zampier, 1999).

Ansiolíticos, sobretudo os benzodiazepínicos como diazepam, podem ser recomendados como adjuvantes no tratamento da dor. Estes agentes não eliminam o agente etiológico da dor, mas alteram a percepção ou reação do paciente ao processo doloroso, sendo assim são indicados como terapia de suporte (Sobreira e Zampier, 1999). Os antidepressivos são bastante indicados para o tratamento de síndromes dolorosas. A amitriptilina é uma das mais estudadas e possui eficácia comprovada. No entanto esses agentes podem causar efeitos colaterais (sonolência, retenção urinária, taquicardia e hipotensão ortostática), que limitam o seu uso e favorecem a descontinuação do tratamento. Os relaxantes musculares são importantes para pacientes que apresentam contratura muscular ou alteração do sono associados à dor. No caso das DTMs podem proporcionar melhora significativa da função mandibular e alívio da dor durante a mastigação. Estes medicamentos induzem relaxamento central dos músculos pela supressão parcial dos impulsos nervosos para os músculos estriados (DosSantos, 1995).

As opções medicamentosas existentes para o tratamento da dor crônica orofacial trazem algum benefício, no entanto são relacionadas a importantes efeitos colaterais. As doses mais efetivas variam entre os pacientes, entretanto a completa eliminação da dor é rara (Attal et al., 2006; Finnerup et al., 2005). Sendo assim, intervenções terapêuticas alternativas precisam ser pesquisadas para alcançar vias do processo de doença não contempladas com a terapêutica clássica.

Neste contexto, a melatonina tem sido investigada como uma opção terapêutica atrativa no tratamento da dor crônica orofacial (Vidor et al., 2013). A melatonina é um neuro-hormônio sintetizado e secretado pela glândula pineal, com importante função na regulação de ritmos circadianos (Arendt e Skene, 2005). A melatonina é liberada durante o período escuro e sinaliza a

existência e a duração deste período. Portanto, sinaliza a alternância entre claro/escuro e entre as estações do ano (Claustrat et al., 2005). Sua produção começa a aumentar no início da noite, atinge um pico de 60 a 100 vezes no início da madrugada e diminui gradualmente, sendo considerada a expressão hormonal do relógio biológico (Macchi e Bruce, 2004).

Esse neuro-hormônio é sintetizado a partir do L-triptofano e, além de seu marcante papel cronobiológico na regulação de funções neuroendócrinas e fisiológicas, apresenta também propriedades farmacológicas, como atividade sedativa, ansiolítica, antidepressiva, antioxidante, anti-inflamatória e analgésica (Ambriz-Tututi et al., 2009).

Os primeiros registros do efeito antinociceptivo da melatonina datam de 1971 em um estudo de Lutsch e Morris que afirmavam que animais eram menos sensíveis à noite (período escuro) quando os níveis plasmáticos de melatonina são significativamente mais altos. Posteriormente, estudos utilizando os aparatos *tail-flick* e placa quente mostraram o efeito antinociceptivo da melatonina administrada intraperitoneal (i.p.) ou intracerebroventricular (i.c.v.) (Ambriz-Tututi et al., 2009).

Existem vários possíveis mecanismos pelos quais este neuro-hormônio pode interferir no processo inflamatório e algogênico. Os receptores melatoninérgicos MT1 e MT2 têm sido identificados em estruturas do sistema nervoso central envolvidos com a transmissão nociceptiva (Ambriz-Tututi et al., 2009), como tálamo, corno dorsal da medula espinhal, trato espinhal do trigêmeo e núcleos trigeminais (Weaver et al., 1989; Williams et al., 1995). Estes receptores desempenham um papel fundamental na antinocicepção induzida pela melatonina em modelos animais de dor inflamatória e neuropática (Ambriz-Tututi e Granados-Soto, 2007; 2009). Há estudos que sugerem que a ligação da melatonina a seus receptores MT1 e MT2 reduzem a concentração de AMP cíclico e modificam a função de canais iônicos de cálcio e potássio ( $Ca^{+2}$  e  $K^{+}$ ) mecanismo semelhante ao exercido por opioides e GABA (Vanecek, 1998; Arreola-Espino et

al, 2007; Wilhelmsen et al., 2011). Outros mecanismos sugeridos para o efeito antinociceptivo da melatonina são a inibição da produção de óxido nítrico e redução da expressão da enzima óxido nítrico-sintetase, a ativação do fator de transcrição nuclear kapa B (NF- $\kappa$ B), a redução dos níveis de prostaglandinas e da expressão da cicloxigenase-2 (COX2) e redução do recrutamento de polimorfonucleares no sítio inflamado (Cuzzocrea et al, 1997; Wilhelmsen et al., 2011). Estudo utilizando antagonista opioide  $\mu$  (Naloxona), mostrou a reversão do efeito antinociceptivo da administração de melatonina (30mg/Kg i.p) em camundongos no teste da placa quente, este resultado sugere o envolvimento de receptores opioides no processo antinociceptivo da melatonina (Ambriz-Tututi et al., 2009).

Além disso, pesquisadores sugerem que o efeito antinociceptivo da melatonina envolve a ativação de centros supra-espinhais (Yu et al, 2000) e inibição do fenômeno *wind-up* (Esposito et al, 2010). Essa hipótese é corroborada por Laurido et al. (2002) que afirmam que a melatonina pode deprimir o fenômeno de *wind-up* na medula espinhal de ratos, provavelmente por hiperpolarização dos neurônios do corno dorsal após sua ligação a seus receptores metabotrópicos.

Estudos prévios de nosso grupo demonstraram o efeito analgésico da melatonina em modelo de inflamação crônica em ratos (Laste et al., 2012) e em pacientes com disfunção temporomandibular (Vidor et al., 2013). Além disto, Laste et al. (2015) demonstraram que a administração de melatonina reduz níveis centrais de BDNF em animais submetidos a um modelo agudo de inflamação. O BDNF é uma neurotrofina amplamente distribuída nos SNC e exerce um papel regulador na dor inflamatória e na hiperalgesia secundária (Zhao et al., 2006). Ligado ao receptor TrkB na superfície neuronal, o BDNF regula e promove a sobrevivência neuronal e o crescimento neural e mantém a conectividade sináptica (Zhang et al., 2009).

A maior parte dos estudos que envolvem melatonina e regulação da dor direciona-se para a atuação da melatonina no gânglio da raiz dorsal e na medula espinhal que estão relacionados à

modulação da dor em regiões de tronco e membros. Poucos estudos focam no papel da melatonina relacionada às dores orofaciais e às vias trigeminais envolvidas (Huang et al., 2013), destacando a necessidade de mais estudos avaliando o efeito da melatonina em diferentes quadros de dor orofacial.

### **1.5 Tratamento não-farmacológico das DTMs – Estimulação Transcraniana por Corrente Contínua (ETCC)**

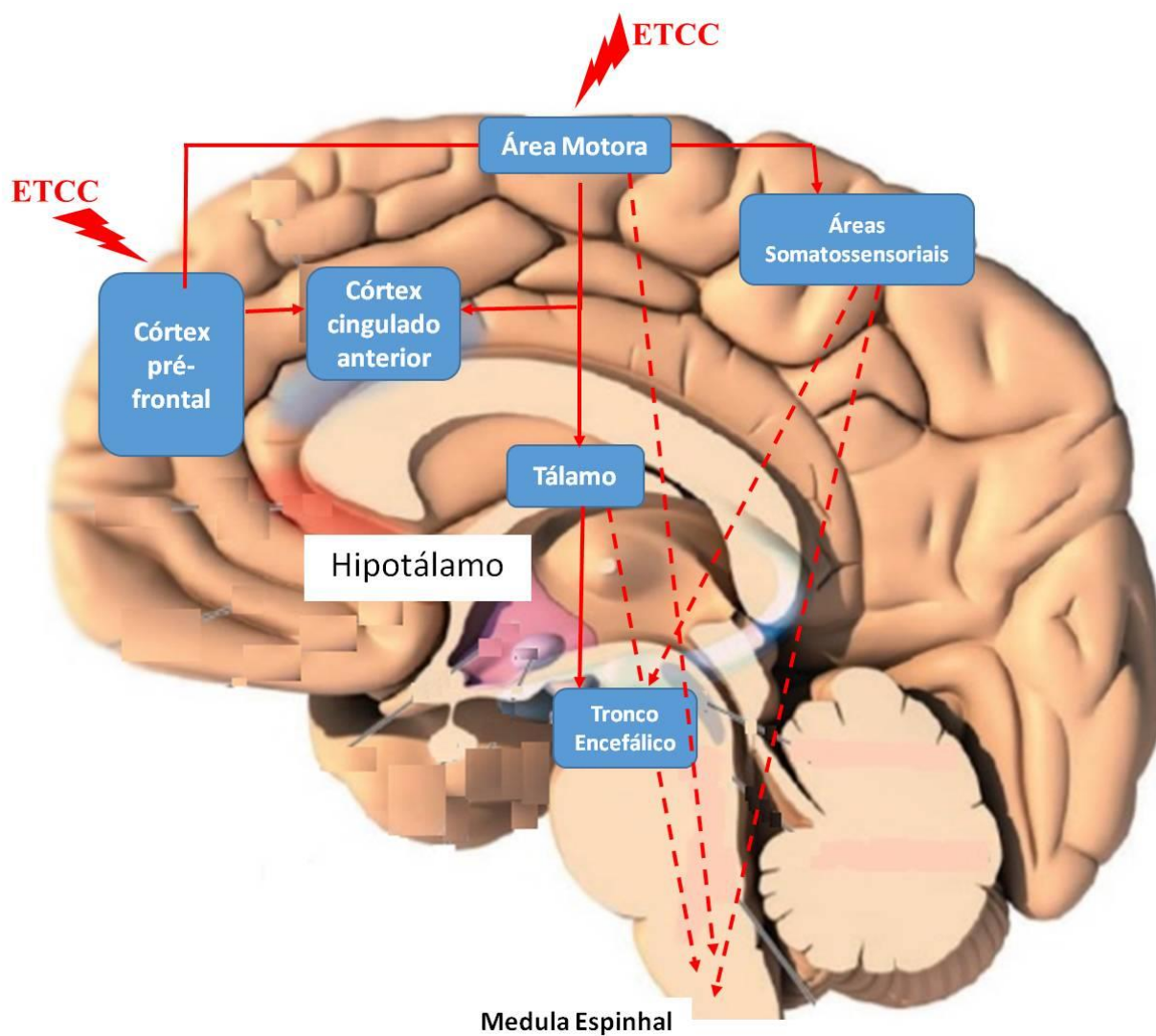
Entre as opções não-farmacológicas para o tratamento da dor crônica, as técnicas de neuromodulação têm sido bastante discutidas. Estas técnicas baseiam-se na alteração da atividade neuronal por meio da aplicação de agentes magnéticos ou elétricos em regiões cerebrais ou periféricas (Zaghi, Heine e Fregni, 2009). Entre estas técnicas, a estimulação magnética transcraniana repetitiva (*repetitive transcranial magnetic stimulation – rTMS*) consiste na liberação em sequência de pulsos magnéticos de mesma frequência e intensidade, gerando um campo magnético sobre o córtex cerebral induzido por meio de uma bobina posicionada sobre o crânio (Fitzgerald et al., 2006). Por outro lado, a estimulação transcraniana por corrente contínua (ETCC) consiste na aplicação de uma corrente fraca aplicada por meio de eletrodos sobre o couro cabeludo, induzindo mudanças na excitabilidade cortical (Nitsche e Paulus, 2000), proporcionando mínimo desconforto, baixo custo e poucos efeitos adversos para o paciente (Nitsche et al., 2008).

O efeito modulador da ETCC sobre o córtex cerebral ocorre devido à hiperpolarização ou despolarização, ou seja, alterando a excitabilidade cortical. Esta mudança na excitabilidade depende do tipo de estimulação aplicada, a catódica hiperpolariza (diminui a excitabilidade); a anódica tipicamente despolariza (aumenta a excitabilidade) dos neurônios corticais. Portanto os efeitos da ETCC, em curto prazo, ocorrem devido a uma diminuição (anódica) ou aumento (catódica) do limiar de repouso neuronal (Bindman et al, 1964).

A ETCC tem sido avaliada em investigações pré-clínicas e em estudos clínicos envolvendo dor crônica (Antal et al., 2010; Fregni et al., 2006a; 2006b; Laste et al., 2012), transtornos psiquiátricos (Brunoni et al., 2014) e neurológicos (Liebetanz et al. 2006). Estudos clínicos mostram que a estimulação do córtex motor altera a excitabilidade cortical de acordo com a polaridade da estimulação. Ou seja, a estimulação anódica, que aumenta a excitabilidade cortical, seria mais efetiva no tratamento de síndromes dolorosas. Enquanto que a estimulação catódica, que levaria a uma diminuição da excitabilidade cortical, seria mais efetiva no tratamento de transtornos depressivos (Nitsche e Paulus 2001; Fregni et al., 2006c).

Estudos prévios de nosso grupo, utilizando modelos animais, confirmam o efeito antinociceptivo da ETCC em modelos de dor decorrente de inflamação crônica (Laste et al., 2012) e em hiperalgesia induzida por estresse crônico (Spezia Adachi et al., 2012) a curto e médio prazo. Animais não submetidos ao modelo de dor não apresentaram resposta ao tratamento com ETCC sugerindo que o efeito desta técnica seja dependente do estado basal do animal.

O modelo clínico de estimulação cerebral não invasiva para o tratamento da dor crônica foca, sobretudo, na estimulação das áreas do córtex motor primário (M1) e do córtex pré-frontal dorso lateral (DLPFC). Originalmente, a estimulação de M1 pode alterar a atividade neuronal em circuitos corticais como o córtex cingulado anterior (ACC) e subcorticais (tálamo) (Fregni e Pascual-Leone, 2007). Estas regiões citadas acima, somadas ao córtex somatossensorial e ao tronco encefálico, apresentam conexões diretas com medula espinhal e são capazes de alterar informações nociceptivas ascendentes. Adicionalmente, o efeito da ETCC envolve projeções para áreas remotas como área cinzenta periaquedutal que compõe parte do sistema descendente inibitório (Heinricher et al., 2009), propondo um efeito do tipo *top down* da ETCC (Lima e Fregni, 2008) (Figura 2).



**Figura 2.** Efeito modulatório da ETCC em diferentes regiões do SNC. Ação direta da ETCC (linha contínua), ação indireta da ETCC (linha tracejada). Modificado de Spezia-Adachi et al. (2015).

## **2 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO**

## **2 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO**

Quadros de dor crônica acarretam um alto custo para sociedade e para o sistema de saúde e são devastadores para a qualidade de vida dos pacientes por torná-los incapacitados para suas atividades diárias. Mais especificamente a dor na região facial, em especial em boca, pode ser muito angustiante para o paciente devido ao contexto psicológico e emocional desta área do corpo. Apesar destas implicações, os tratamentos disponíveis para a dor crônica orofacial nem sempre eliminam completamente a dor e/ou implicam em efeitos adversos que limitam o seu uso, indicando a necessidade da busca de novas opções terapêuticas mais efetivas. Sabe-se que a dor crônica orofacial envolve alterações plásticas nos sistemas de modulação da dor, sendo assim este estudo propõe duas novas opções terapêuticas (uma não farmacológica e uma farmacológica) e investiga, por meio da avaliação dos níveis de citocinas e fatores neurotróficos, possíveis mecanismos de ação destas opções terapêuticas.



**3 HIPÓTESES**

### **3 HIPÓTESES**

#### **3.1 Hipótese 1**

A estimulação transcraniana por corrente contínua (ETCC) é capaz de reduzir a resposta hiperalgésica de ratos submetidos a um modelo de dor crônica orofacial (disfunção temporomandibular). E esta redução envolve alterações nos níveis de citocinas (IL-6 e IL-10) e fatores neurotróficos (BDNF e NGF) em nível periférico (soro) e central (tronco encefálico).

#### **3.2 Hipótese 2**

A melatonina é capaz de reduzir a resposta hiperalgésica de ratos submetidos a um modelo de dor crônica orofacial (disfunção temporomandibular), alterando os níveis de citocinas (IL-6 e IL-10) e fatores neurotróficos (BDNF e NGF) em tronco encefálico.

**4 OBJETIVOS**

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo Geral**

Avaliar o efeito antinociceptivo de novas opções terapêuticas (estimulação transcraniana por corrente contínua - ETCC e melatonina) em um modelo de dor crônica orofacial (disfunção temporomandibular) induzida por adjuvante completo de Freund (CFA).

### **4.2 Objetivos Específicos**

1. Avaliar o efeito analgésico da ETCC na resposta hiperalgésica mecânica por meio do teste de von Frey facial;
2. Avaliar o efeito analgésico da ETCC na resposta hiperalgésica térmica por meio do teste da placa quente;
3. Verificar se os efeitos da ETCC estão relacionados a alterações nos níveis de citocinas (IL-6 e IL-10) e fatores neurotróficos (BDNF e NGF) em nível periférico (soro) e central (tronco encefálico).
4. Avaliar o efeito analgésico da melatonina na resposta hiperalgésica mecânica por meio do teste de von Frey facial;
5. Avaliar o efeito analgésico da melatonina na resposta hiperalgésica térmica por meio do teste da placa quente;
6. Verificar se os efeitos da melatonina estão relacionados a alterações nos níveis nos níveis de citocinas (IL-6 e IL-10) e fatores neurotróficos (BDNF e NGF) em nível central (tronco encefálico).

## **5 MATERIAIS E MÉTODOS**

## **5 MATERIAIS E MÉTODOS**

Este estudo experimental foi composto por dois protocolos experimentais. Em comum, ambos os protocolos compartilham o local de pesquisa, o modelo de dor e os testes comportamentais aplicados, assim como a eutanásia dos animais e o processamento das amostras.

### **5.1 Local da Pesquisa**

Este estudo foi desenvolvido no Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), nas Unidades de Experimentação Animal (UEA) e Análise Molecular e Proteínas (UAMP) e no Laboratório de Anatomia Patológica Experimental do HCPA.

### **5.2 Animais**

Foram utilizados ratos machos *Sprague-Dawley* com 60 dias, pesando entre 250-300g, provenientes da UEA/HCPA. Os animais foram mantidos em condições ideais de biotério: ciclo claro-escuro de 12 horas, em temperatura ambiente ( $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e livre acesso à água e ração Nuvital (Moinhos Purina, Porto Alegre, RS/Brasil). Todos os procedimentos aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do HCPA (GPPG-HCPA protocolo número: 12-0104) e CEUA/UFRGS (protocolo número 22356). Todos os experimentos foram realizados em sala silenciosa, com temperatura controlada e vinte e quatro horas antes da realização de experimentos, os animais, foram levados à sala do experimento para ambientação.

### **5.3 Modelo de Dor Orofacial Induzida por Adjuvante Completo de Freund (CFA)**

Para padronização do local da injeção (ATM esquerda) foi utilizado corante Azul de Evans em estudo piloto. A região da ATM esquerda foi tricotomizada para melhorar o acesso ao local da injeção e em seguida os animais foram anestesiados com isoflurano (indução 5% - Smith, 2003; manutenção 2,5% - Vaillancourt, 1999, Wood, 2001). O sítio de injeção na ATM foi identificado por palpação do arco zigomático e côndilo mandibular. Uma agulha 30G foi inserida no ponto imediatamente inferior ao bordo póstero-inferior do arco zigomático (Zhou et al., 1999). O modelo de dor orofacial (DTM) foi induzido por administração de 25µL de CFA (*Mycobacterium tuberculosis*, Sigma St Louis) homogeneizado em solução salina (óleo /salina, 1:1) totalizando 50 µL de volume final. Os animais submetidos ao Sham do modelo de dor receberam o mesmo volume de solução salina na articulação (Spears et al., 2005; Nascimento e Leite-Panissi, 2013).

### **5.4 Testes Comportamentais**

#### **5.4.1 Hiperalgisia Mecânica (von Frey facial)**

Para a aplicação dos estímulos mecânicos, os animais foram habituados 24h antes do experimento por pelo menos 30 min na sala e nas caixas de observação onde os testes foram realizados. No dia do teste, os animais foram contidos manualmente e o sensor do analgesímetro foi aplicado na região sensibilizada da face do animal (Figura 3). O teste baseia-se na pressão máxima em gramas (g) necessária para que o animal demonstre comportamento nociceptivo característico como movimento de retirada da face ou vocalização (Fruhstorfer et al., 2001). Cada animal recebeu este estímulo três vezes e a média destes valores foi considerado o limiar de hiperalgisia mecânica.



**Figura 3.** Teste de von Frey facial. Representação da avaliação da sensibilidade mecânica orofacial utilizando anestesiômetro de Von Frey eletrônico (Insight Instrumentos, Ribeirão Preto, Brasil). Fonte: autor.

#### **5.4.2 Hiperálgia térmica (Teste da Placa quente)**

Os ratos foram habituados 24 horas antes do teste por um período de 10 minutos no interior do aparato desligado. Durante o teste, a temperatura da placa foi mantida em  $55^{\circ}\text{C}\pm 0,1$  (Ugo Basile Hot/Cold Plate 35100<sup>®</sup>). Os animais foram colocados em um cilindro transparente de polipropileno sobre a superfície aquecida e o tempo entre a colocação dos animais e o início de retirada das patas ou “sapateado” foram registrados como latência de resposta em segundos, sendo uma única medida em cada período de avaliação (MacDonald e Woolfe, 1946) (Figura 4).





**Figura 4.** Teste da Placa Quente. Representação da avaliação da sensibilidade térmica (Fonte: Ugo Basile Hot/Cold Plate 35100®).

## 5.5 Protocolos Experimentais

### 5.5.1 Protocolo 1

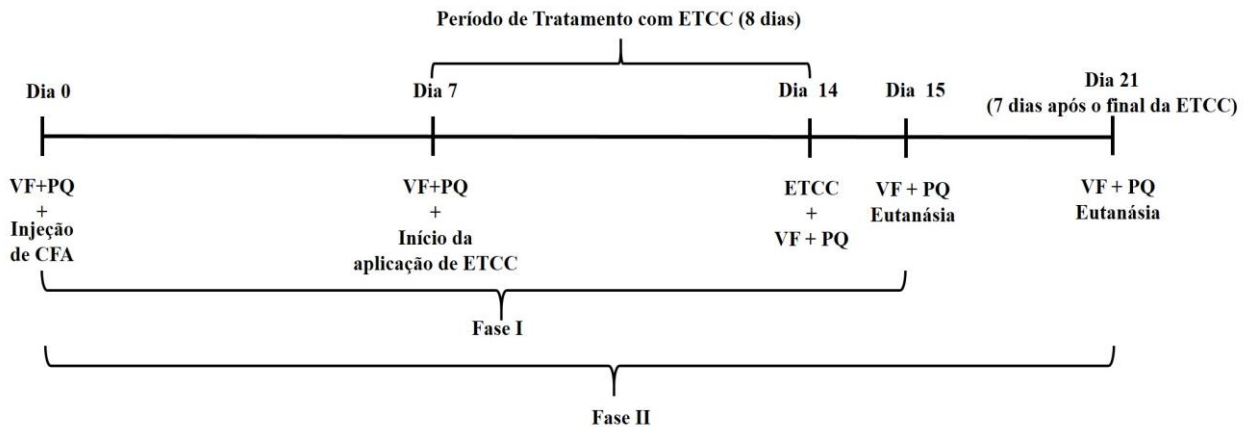
#### 5.5.1.1 Delineamento

Estudo de caráter experimental no qual ratos foram submetidos a um modelo de dor crônica orofacial (DTM) e tratados com uma sessão diária de ETCC por 8 dias consecutivos.

#### 5.5.1.2 Desenho Experimental

O estabelecimento do modelo de dor orofacial ocorre sete dias após a injeção intra-articular de CFA (dia 7), no qual é iniciado o tratamento com ETCC, por oito dias consecutivos. O experimento consistiu em duas fases: os animais da fase I foram eutanasiados 24h após a última sessão de tratamento com ETCC (dia 15), enquanto que os animais da fase II foram eutanasiados sete dias após a última sessão de ETCC (dia 21). Para análise do decurso temporal da hipernociceção mecânica e térmica, os animais foram avaliados em diferentes períodos: no basal (antes da indução do modelo de dor), sete dias após a indução do modelo (antes de iniciar o

tratamento com ETCC), imediatamente, 24h e sete dias após o final da última sessão de ETCC (apenas para animais da fase II) (Figura 5).



**Figura 5:** Desenho experimental do protocolo 1. VF (teste de Von Frey facial), PQ (teste da placa quente). 24h antes dos testes comportamentais os animais passavam por procedimento de habituação aos testes nociceptivos de acordo com o descrito nos itens 5.4.1 e 5.4.2.

### 5.5.1.3 Tratamento com Estimulação Transcraniana por Corrente Contínua (ETCC)

Sete dias após a indução da dor orofacial foi iniciado o tratamento com ETCC. Durante a estimulação, os animais permaneceram imobilizados, em sala iluminada e silenciosa, sem utilização de anestesia como citado em modelos anteriores de estimulação animal (Laste et al., 2012; Spezia Adachi et al., 2012), permitindo assim, maior semelhança ao modelo de estimulação utilizado em humanos. Inicialmente, foi realizada tricotomia na região onde foram colocados os eletrodos para uma melhor aderência. O estimulador gera uma corrente elétrica constante que é conduzida até os eletrodos de ECG que possuem adesivo (hidrogel) condutivo. Após o posicionamento dos eletrodos, estes foram fixados com fita adesiva (Micropore®) para prevenir a remoção dos mesmos. A corrente constante de 0,5mA foi utilizada por ter sido capaz de gerar efeito antinociceptivo em outros modelos de dor desenvolvidos em estudos prévios do grupo (Laste et al., 2012; Spezia Adachi et al., 2012). O tratamento consiste em uma aplicação diária, durante 20

minutos por oito dias consecutivos. O eletrodo do cátodo foi posicionado na região supraorbital e o do ânodo no córtex parietal entre as orelhas. A posição dos eletrodos induz alívio na dor (Fregni et al. 2006a; 2006b) segundo a literatura citada e de acordo com outros estudos desenvolvidos em nosso grupo de pesquisa utilizando modelo de dor inflamatória crônica na pata e modelo de hiperalgesia decorrente de estresse crônico (Laste et al., 2012; Spezia Adachi et al., 2012, respectivamente) (Figura 6).

Nos animais submetidos ao sham-ETCC, foi realizada tricotomia prévia na região onde foram colocados os eletrodos. Após o posicionamento dos eletrodos, eles foram fixados com fita adesiva (Micropore®) para prevenir a sua remoção. A corrente constante de 0,5mA foi aplicada por 30 segundos, sendo a bateria desligada dos conectores após esse período. O animal permaneceu com os eletrodos fixados à cabeça durante os mesmos 20 minutos dos grupos de ETCC, porém sem estimulação ativa, simulando o protocolo utilizado em humanos.



**Figura 6:** posicionamento dos eletrodos sobre o escalpo para o tratamento com ETCC. O eletrodo do cátodo é posicionado na linha média entre os olhos. O eletrodo do ânodo é posicionado sobre a linha média na área parietal (entre as orelhas). Fonte: Spezia Adachi et al., 2012, com autorização.

#### 5.5.1.4 Grupos Experimentais

Foram utilizados 144 ratos machos *Sprague-Dawley* com 60 dias e os animais foram randomizados (por peso) em seis grupos:

1. Grupo Controle Total (C): não recebeu qualquer manipulação;
2. Grupo Salina-Sham ETCC (SS): recebeu solução salina na ATM e foi submetido apenas ao Sham-ETCC;
3. Grupo Salina-ETCC (ST): recebeu solução salina na ATM e foi submetido ao tratamento ativo com ETCC;
4. Grupo Dor Orofacial (O): foi submetido ao modelo de dor (CFA intra-articular) e não recebeu tratamento;
5. Grupo Dor Orofacial-Sham ETCC (OS): foi submetido ao modelo de dor (CFA intra-articular) e recebeu Sham-ETCC;
6. Grupo Dor Orofacial-ETCC (OT): foi submetido ao modelo de dor (CFA intra-articular) e recebeu tratamento ativo com ETCC;

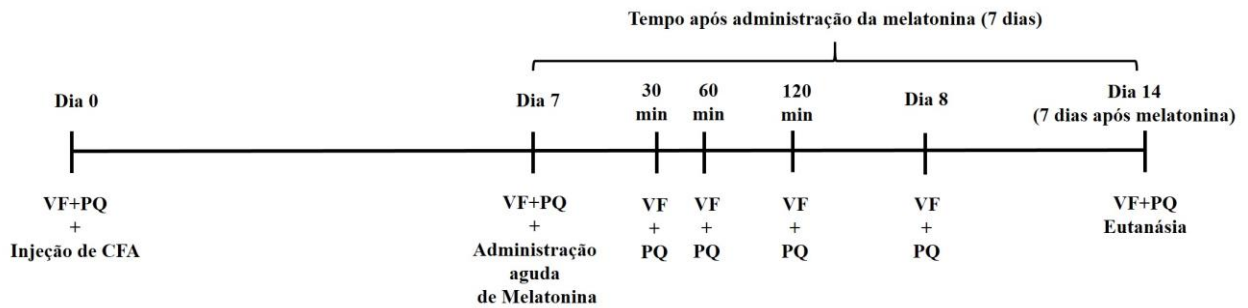
## **5.5.2 Protocolo 2**

### **5.5.2.1 Delineamento**

Este estudo tem caráter experimental no qual ratos foram submetidos a um modelo de dor crônica orofacial (DTM) e tratados com administração aguda de melatonina.

### **5.5.2.2 Desenho Experimental**

Os animais foram submetidos ao modelo de dor (dia 0), sete dias após a o estabelecimento do modelo (dia 7) realizou-se a administração aguda de melatonina. Para análise do decurso temporal da hipernocicepção mecânica e térmica, os animais foram avaliados em diferentes períodos: no basal (antes da indução do modelo de dor), sete dias após a indução do modelo (dia 7), 30, 60 e 120 min, 24h e sete dias após a administração da melatonina (dia 14). A eutanásia destes animais ocorreu sete dias após a administração da melatonina (dia 14) (Figura 7).



**Figura 7:** Desenho experimental do protocolo 2. VF (teste de Von Frey facial), PQ (teste da placa quente). 24h antes dos testes comportamentais os animais passavam por procedimento de habituação aos testes nociceptivos de acordo com o descrito nos itens 5.4.1 e 5.4.2.

### 5.5.2.3 Tratamento com Melatonina

Sete dias após a indução da dor orofacial foi administrada a dose aguda de melatonina. Os animais do grupo tratamento receberam uma dose aguda de melatonina (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., USA) por meio de injeção intraperitoneal (i.p.) (50 mg/kg, solução final 50 mg/ml) (Laste et al., 2013; Wilhelmsen et al., 2011). O veículo de diluição da melatonina foi etanol 1% em salina. O mesmo volume de veículo da melatonina foi administrado nos animais do grupo veículo por via i.p.

### 5.5.2.4 Grupos Experimentais

Foram utilizados 36 ratos machos *Sprague-Dawley* com 60 dias e os animais foram randomizados (por peso) em seis grupos:

1. Grupo Controle Total (C): não recebeu qualquer manipulação;
2. Grupo Salina-Veículo (SV): recebeu solução salina na ATM e tratamento com veículo;
3. Grupo Salina-Melatonina (SM): recebeu solução salina na ATM e foi submetido ao tratamento com melatonina;

4. Grupo Dor Orofacial (O): foi submetido ao modelo de dor (CFA intra-articular) e não recebeu tratamento;

5. Grupo Dor Orofacial-Veículo (OV): foi submetido ao modelo de dor (CFA intra-articular) e tratamento com veículo;

6. Grupo Dor Orofacial-Melatonina (OM): foi submetido ao modelo de dor (CFA intra-articular) e recebeu tratamento com melatonina;

### **5.6 Eutanásia dos Animais e Preparação das Amostras**

Ao término do período experimental, os animais foram eutanasiados por decapitação sem uso de anestésico. É importante salientar que o modelo previa a verificação dos efeitos neuroquímicos e dosagens bioquímicas que podem ser alteradas pela utilização de anestesia na morte desses animais (Bickler e Fahlman, 2006; Lu et al., 2006). Os métodos farmacológicos interfeririam com a finalidade dos experimentos, que era observar neuroquimicamente os efeitos do tratamento no SNC (tronco encefálico). Os barbitúricos, anestésicos gerais mais utilizados, são potentes hipnóticos, que produzem depressão dose-dependente do SNC. Portanto, devido ao objetivo do trabalho, foi necessário utilizar a eutanásia por guilhotinamento (Bickler e Fahlman, 2006; Lu et al., 2006). Além do que, estudos já demonstraram que a decapitação causa inconsciência rápida e indolor (Holson, 1992; van Rijn et al., 2011). Os pesquisadores que executaram este procedimento possuíam experiência nesta forma de eutanásia, o equipamento utilizado era específico para este fim e foram obedecidas as Diretrizes da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), contidas na Resolução Normativa nº 13 de 20 de setembro de 2013. Além disso, esta técnica permite a coleta de grande volume de sangue para análises sorológicas. O sangue troncular foi coletado em tubos plásticos e centrifugado 5 minutos em 5000 rpm em temperatura 4°C, e o soro, acondicionado em microtubo

sem alíquotas de 250 $\mu$ L. O tronco encefálico foi retirado e acondicionado em microtubos. O soro e o tronco foram congelados a -80°C para análises posteriores.

### **5.7 Análise Histológica Referente ao Protocolo 1**

Depois de removido o tronco encefálico, a ATM esquerda dos animais foi retirada e colocada em ácido nítrico 10% por 48 horas. Após a descalcificação foram fixadas em formol tamponado por 48 horas. Os espécimes foram então incluídos em parafina e os blocos, identificados e submetidos à microtomia. Cortes de 5  $\mu$ m foram corados em Hematoxilina-Eosina (HE). A análise qualitativa do grau de inflamação na área retrodiscal foi realizada por microscopia óptica (40X). A porcentagem de infiltrados foi baseada em escores: 0 = ausente, 1 = leve (1–10%), 2 = moderada (11–50%), 3 = severa (51–100%), de acordo com Laste et al. (2013). Esta medida foi realizada por examinador cego com relação aos grupos experimentais.

### **5.8 Dosagens Bioquímicas**

Os níveis de BDNF, NGF, IL-10 e IL-6 em tronco encefálico (protocolo 1 e 2) e soro (protocolo 1) foram analisados por kit comercial ELISA (ensaio imuno enzimático) para ratos (R&D Systems, Minneapolis, United States). O tecido do tronco encefálico foi homogeneizado em solução comercial com antiproteínases (Sigma<sup>®</sup> #P8340) no volume de 1:10 e centrifugado por cinco minutos a 10.000 rpm. A proteína total foi mensurada pelo método de Bradford (1976). Os resultados foram expressos em pg/mg de proteína para tronco encefálico e em pg/mL para soro.

### **5.9 Análise estatística**

### **5.9.1 Análise Estatística Protocolo 1**

Os dados comportamentais foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) e foram analisados por Equações Estimativas Generalizadas (GEE). Os dados bioquímicos foram apresentados como porcentagem do controle (Média $\pm$ EPM) e analisados por ANOVA de três vias seguida de teste de Student Newman-Keuls (SNK). A análise histológica foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis, utilizando SPSS 20.0 para Windows.

### **5.9.2 Análise Estatística Protocolo 2**

Os dados comportamentais foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) e foram analisados por Equações Estimativas Generalizadas (GEE). Os dados bioquímicos foram apresentados como Média $\pm$ EPM) e analisados por ANOVA de uma via seguida de teste de Student Newman-Keuls (SNK), utilizando SPSS 20.0 para Windows.



## **6 RESULTADOS**

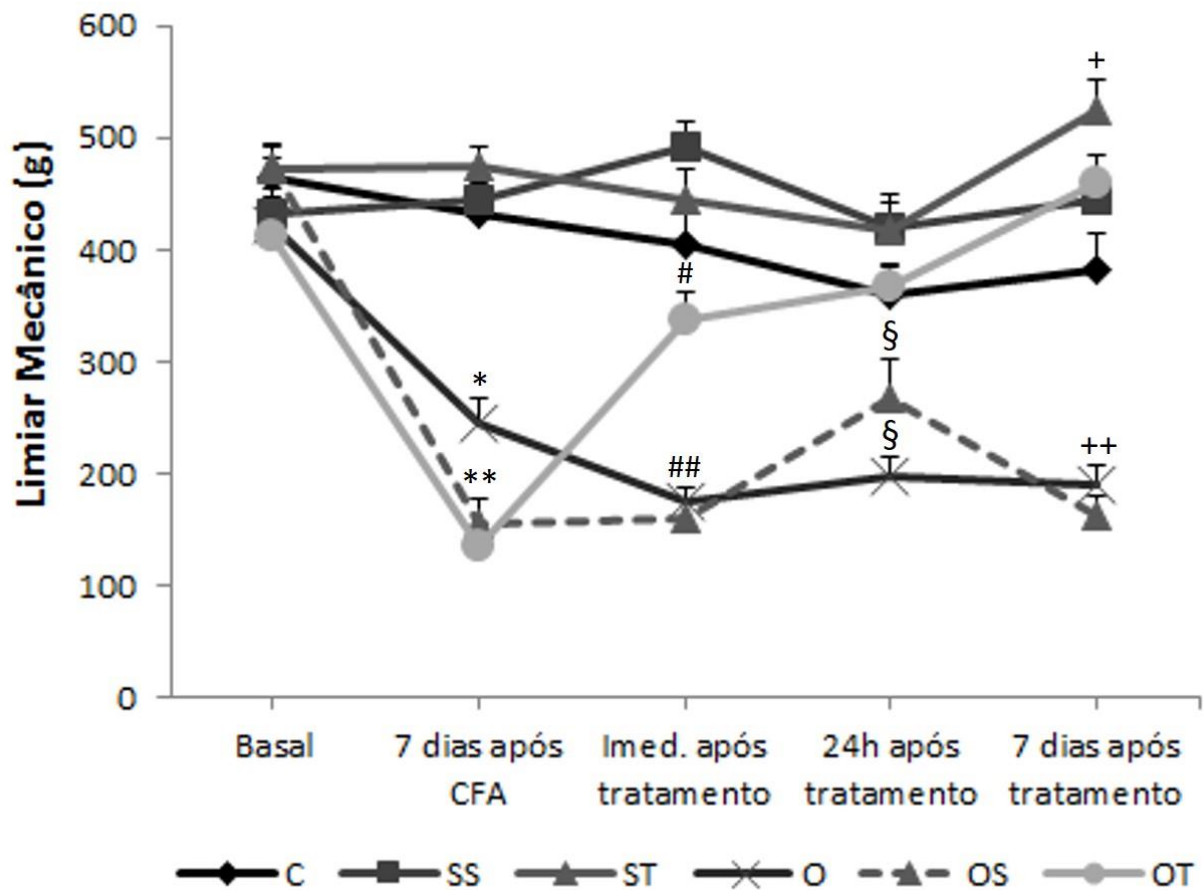
## **6 RESULTADOS**

### **6.1 Protocolo 1**

#### **6.1.1 Comportamento Nociceptivo**

##### **6.1.1.1 Hiperalgisia Mecânica (Teste de Von Frey Facial)**

Sete dias após a indução do modelo confirmou-se a hiperalgisia mecânica nos animais dos grupos dor (O, OS e OT). A ETCC diminuiu a resposta nociceptiva nos animais submetidos ao modelo de dor orofacial comparado aos grupos dor não tratados (O e OS). A análise estatística mostrou interação entre as variáveis tempo x grupo (GEE: Wald  $\chi^2=586,51$ ; 20,  $P<0.001$ ). O grupo dor tratado com ETCC (OT) apresentou aumento no limiar de retirada da face imediatamente, 24h e setes dias após o final do tratamento comparado aos grupos dor não tratados, sugerindo um efeito anti-hiperalgésico cumulativo da ETCC (Figura 8).



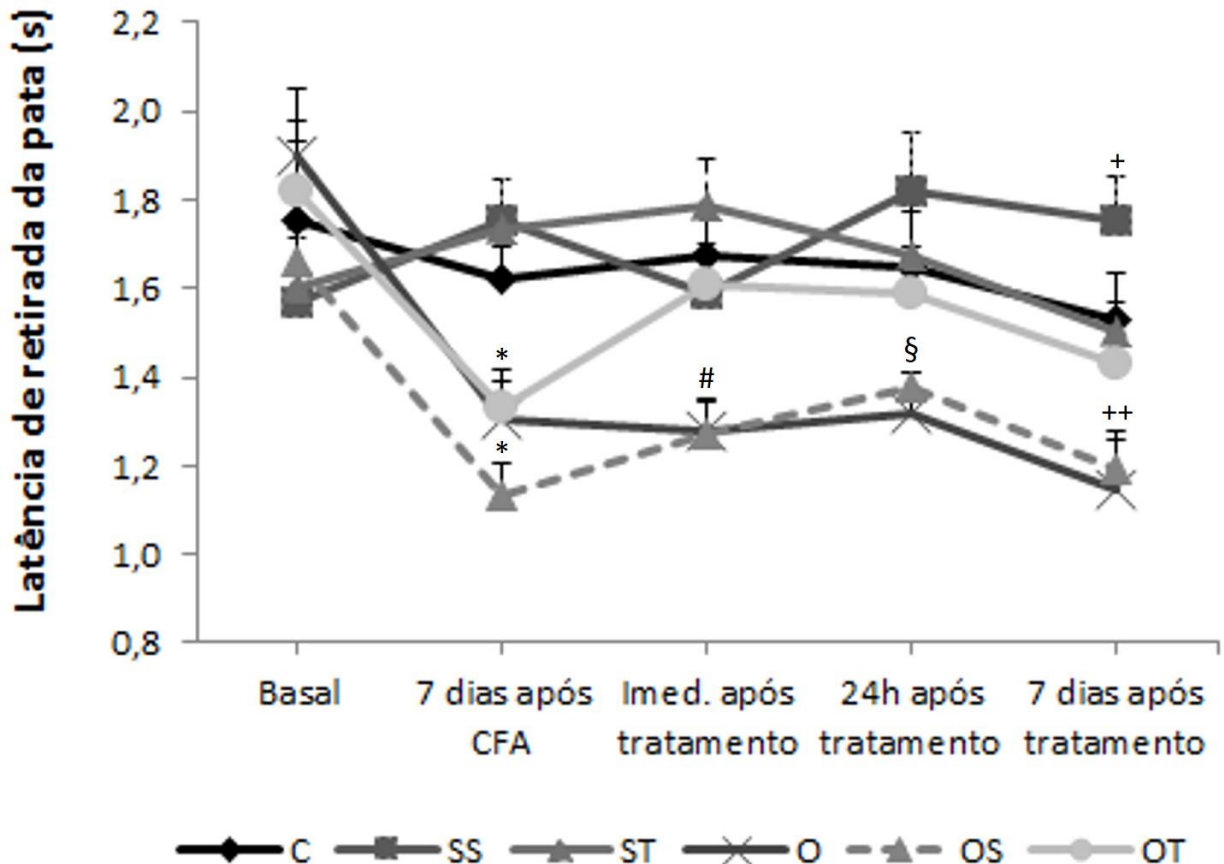
**Figura 8:** Efeito da ETCC na resposta hiperalgésica mecânica, teste de Von Frey. Dados expressos em Média±EPM (N=52). Grupos controle total (C); Salina-Sham ETCC (SS); Salina-ETCC (ST); Dor Orofacial (O); Dor Orofacial-Sham ETCC (OS); Dor Orofacial-ETCC (OT).

\* diferença significativa em relação aos demais grupos C, SS, ST, OS e OT, sete dias após CFA; \*\* diferença significativa em relação aos grupos C, SS, ST e O, sete dias após CFA; # diferença significativa em relação aos grupos SS, ST, O, e OS, imediatamente após a última sessão de ETCC; ## diferença significativa em relação aos grupos C, SS, ST, e OT, imediatamente após a última sessão de ETCC; § diferença significativa em relação aos grupos C, SS, ST e OT, 24h após a última sessão de ETCC; + diferença significativa em relação aos grupos C, O e OS, sete dias após a última sessão de ETCC; ++ diferença significativa em relação aos grupos C, SS, ST e OT, sete dias após a última sessão de ETCC; GEE: (Wald  $\chi^2=586,51$ ; 20,  $P<0.001$ ).

### 6.1.1.2 Hiperalgesia Térmica

A análise estatística mostrou interação entre as variáveis tempo x grupo (GEE: Wald  $\chi^2=175,24$ ; 20,  $P<0.001$ ). Sete dias após a injeção de CFA confirmou-se a hiperalgesia térmica nos animais submetidos ao modelo de dor (grupos O, OS e OT). Esta resposta hiperalgésica foi

modificada após o tratamento com ETCC. A latência foi significativamente aumentada alcançando o nível do grupo controle, após o tratamento com a ETCC (grupo OT) comparado aos grupos que não receberam tratamento (O e OS), sugerindo um efeito anti-hiperalgésico da ETCC (Figura 9).



**Figura 9:** Efeito da ETCC na hiperalgesia térmica (N=52), teste da placa quente. Dados expressos em Média±EPM (N=52). Grupos controle total (C); Salina-Sham ETCC (SS); Salina-ETCC (ST); Dor Orofacial (O); Dor Orofacial-Sham ETCC (OS); Dor Orofacial-ETCC (OT).

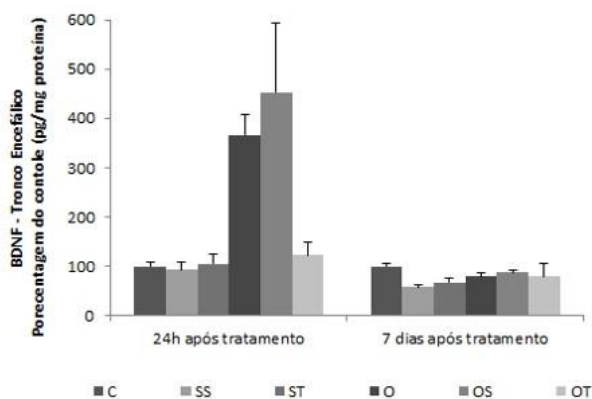
\*diferença significativa em relação aos grupos C, SS e ST, sete dias após CFA; # diferença significativa em relação aos grupos C, SS, ST, e OT, imediatamente após a última sessão de ETCC; § diferença significativa em relação aos grupos C, SS, ST e OT, 24h após a última sessão de ETCC; + diferença significativa em relação aos grupos ST, O, OS e OT, sete dias após a última sessão de ETCC; ++ diferença significativa em relação aos grupos C, SS, ST e OT, sete dias após a última sessão de ETCC. GEE: (Wald  $\chi^2=175.24$ ; 20,  $P<0.001$ ).

## 6.1.2 Análises Bioquímicas

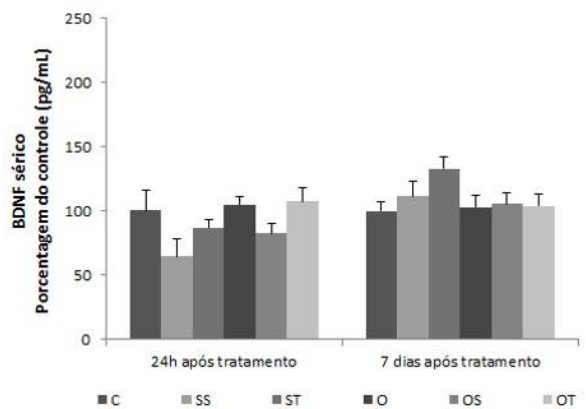
### 6.1.2.1 Níveis de BDNF

Os níveis de BDNF foram avaliados em tronco encefálico e soro. Em tronco encefálico, observou-se interação entre as variáveis independentes: dor orofacial, ETCC e tempo (ANOVA de três vias/SNK,  $F_{(1,64)}=7.86$ ,  $P<0.01$ , figura 10 A). Foi observado que os animais submetidos ao modelo de dor orofacial (grupos O e OS) apresentaram níveis elevados de BDNF em tronco encefálico, que foi revertido pelo tratamento com ETCC somente 24h após a última sessão de ETCC. Em soro, observou-se interação entre dor orofacial e tempo ( $F_{(2,74)}=3,10$ ,  $P<0,01$ ). Sete dias após o final do tratamento houve um aumento dos níveis séricos de BDNF (Figura 10 B).

**Painel A**



**Painel B**



**Figura 10: Níveis de BDNF.** Dados apresentados como porcentagem do controle (Média+EPM). Grupos controle total (C); Salina-Sham ETCC (SS); Salina-ETCC (ST); Dor Orofacial (O); Dor Orofacial-Sham ETCC (OS); Dor Orofacial-ETCC (OT).

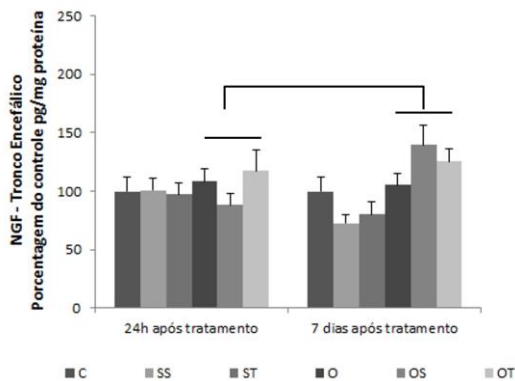
**Painel A. Níveis de BDNF em tronco encefálico.** Houve interação entre as variáveis independentes: dor orofacial, ETCC e tempo (ANOVA de três vias/SNK,  $F_{(1,64)}=7.86$ ,  $P<0.01$ ,  $N=76$ ).

**Painel B. Níveis de BDNF sérico.** Houve interação entre as variáveis independentes: dor orofacial x tempo (ANOVA de três vias/SNK,  $F_{(2,74)}=3.10$ ,  $P<0.01$ ,  $N=86$ ).

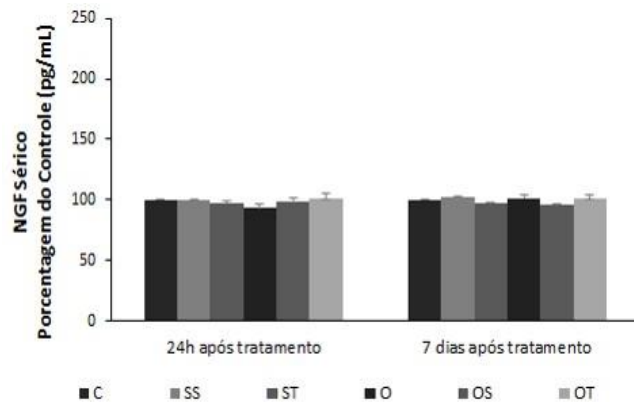
### 6.1.2.2 Níveis de NGF

A análise dos níveis de NGF em tronco encefálico demonstrou interação entre as variáveis independentes: dor orofacial x tempo (ANOVA de três vias/SNK,  $F(2,53)=4.17$ ,  $P<0.05$ , figura 11 A). Sete dias após o final do tratamento com ETCC houve um significativo aumento nos níveis de NGF dos animais expostos ao modelo de dor (O, OS e OT). Não foram observadas diferenças significativas sobre os níveis séricos de NGF (Figura 11 B).

**Painel A**



**Painel B**



**Figura 11: Níveis de NGF.** Dados

apresentados como porcentagem do controle (Média±EPM). Grupos controle total (C); Salina-Sham ETCC (SS); Salina-ETCC (ST); Dor Orofacial (O); Dor Orofacial-Sham ETCC (OS); Dor Orofacial-ETCC (OT).

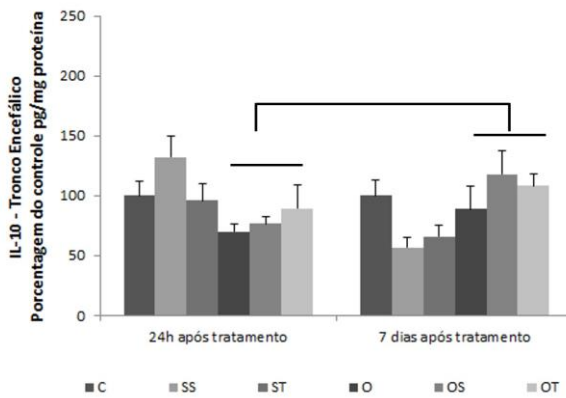
**Painel A. Níveis de NGF em tronco encefálico.** Houve interação entre as variáveis independentes: dor orofacial x tempo (ANOVA de três vias/SNK,  $F(2,53)=4.17$ ,  $P<0.05$ ,  $N=65$ ).

**Painel B. Níveis de NGF sérico.** Não foram observadas diferenças significativas para grupo e tempo sobre os níveis séricos de NGF (ANOVA de três vias,  $P>0.05$ ,  $N=75$ ).

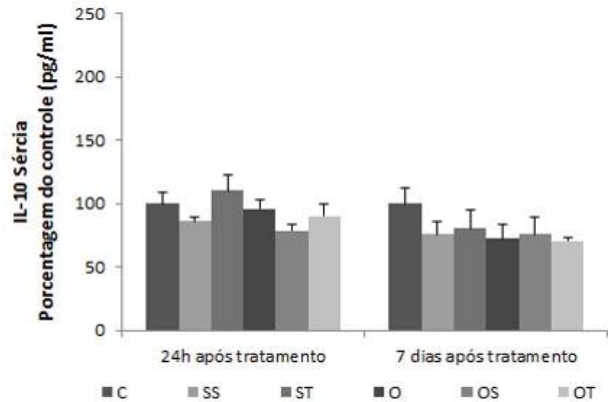
### 6.1.2.3 Níveis de IL-10

A ANOVA de três vias mostrou interação dor orofacial x tempo nos níveis de IL-10 em tronco encefálico ( $F_{(2,66)}=10.72$ ,  $P<0.01$ ). Houve um aumento nos níveis de IL-10 sete dias após o final do tratamento com ETCC comparado aos níveis de 24h após o final do tratamento (figura 12 A). Nos níveis séricos foi observado efeito do tempo ( $F_{(1,73)}=4.36$ ,  $P<0.05$ ), (Figura 12 B).

**Painel A**



**Painel B**



**Figura 12: Níveis de IL-10.** Dados apresentados como porcentagem do controle (Média±EPM). Grupos controle total (C); Salina-Sham ETCC (SS); Salina-ETCC (ST); Dor Orofacial (O); Dor Orofacial-Sham ETCC (OS); Dor Orofacial-ETCC (OT).

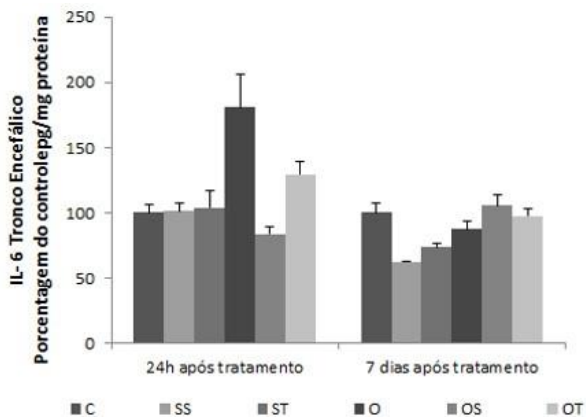
**Painel A. Níveis de IL-10 em tronco encefálico.** Interação entre as variáveis independentes: dor orofacial x tempo (ANOVA de três vias/SNK,  $P<0.01$ ,  $N=78$ ).

**Painel B. Níveis de IL-10 soro.** Houve efeito do tempo (ANOVA de três vias/SNK,  $P<0.05$ ,  $N=85$ ).

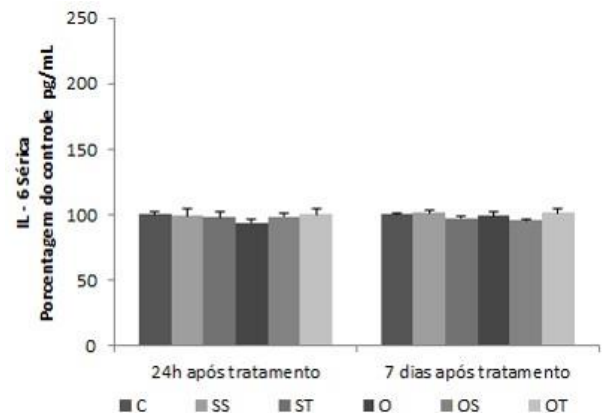
### 6.1.2.4 Níveis de IL-6

Em tronco encefálico foi observada interação dor orofacial x ETCC x tempo sobre os níveis de IL-6 (ANOVA de três vias/SNK,  $F_{(2,48)}=4.84$ ,  $P<0.05$ ). Tanto a estimulação sham quanto ETCC ativa reduziram o aumento nos níveis de IL-6 induzido pelo modelo de dor 24h após o final do tratamento (Figura 13 A). Sobre os níveis séricos não foi observado efeito das variáveis independentes dor, tratamento ou tempo (ANOVA de três vias,  $P>0.05$ ) (Figura 13 B).

**Painel A**



**Painel B**



**Figura 13: Níveis de IL-6.** Dados apresentados como porcentagem do controle (Média±EPM). Grupos controle total (C); Salina-Sham ETCC (SS); Salina-ETCC (ST); Dor Orofacial (O); Dor Orofacial-Sham ETCC (OS); Dor Orofacial-ETCC (OT).

**Painel A. Níveis de IL-6 em tronco encefálico.** Interação entre as variáveis independentes: dor orofacial x ETCC x tempo (ANOVA de três vias/SNK,  $P<0.01$ ,  $N=60$ ).

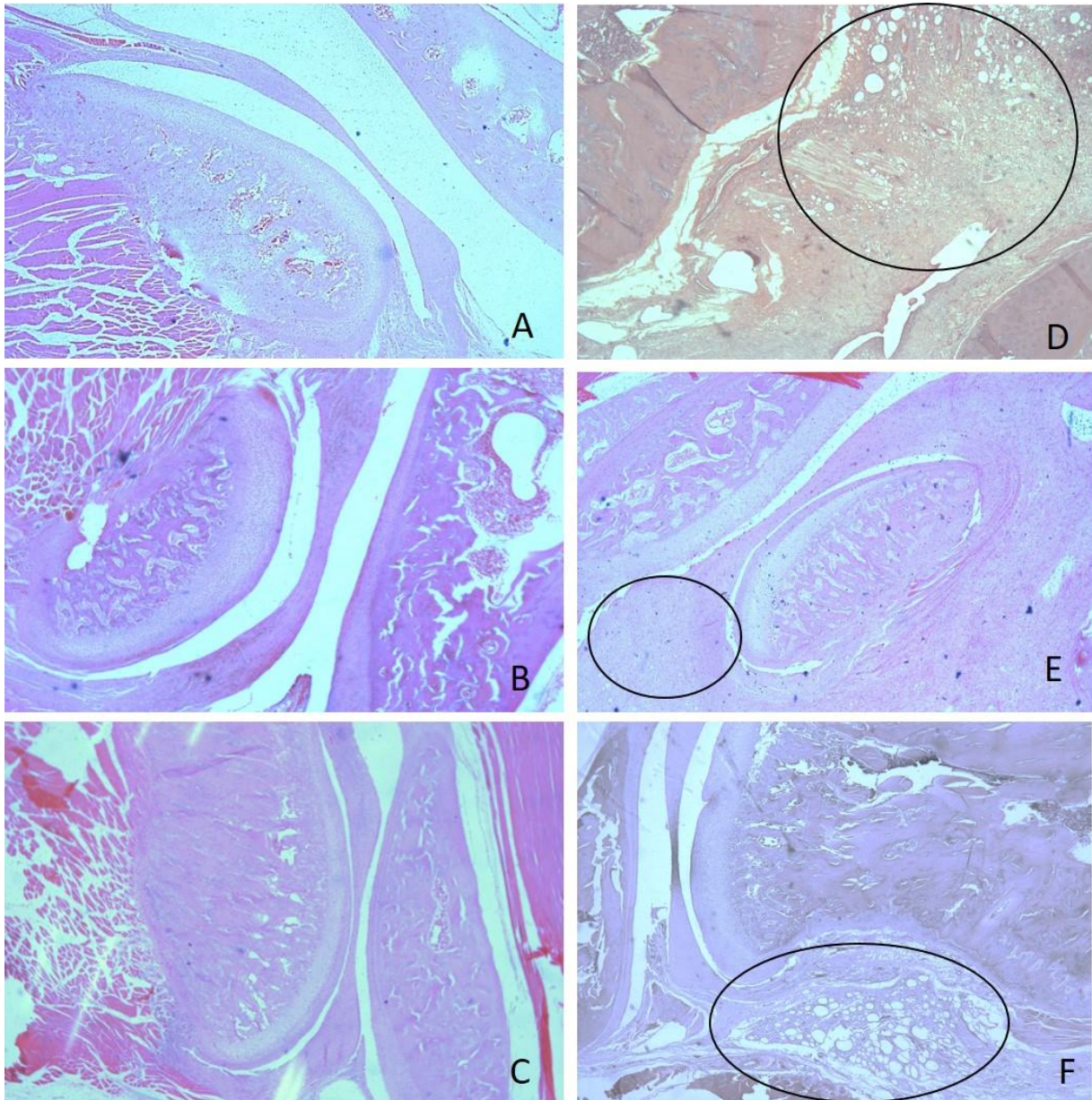
**Painel B. Níveis de IL-6 soro.** Não foram observadas diferenças significativas para grupo e tempo sobre os níveis séricos de IL-6 (ANOVA de três vias  $P>0.05$ ,  $N=75$ ).

### 6.1.3 Análise Histológica

A injeção com CFA provocou uma reação inflamatória com presença de infiltrado mononuclear (macrófagos, neutrófilos e linfócitos) na área retrodiscal (sob a membrana sinovial). Adicionalmente, foi observada fibrose e a presença de numerosos vacúolos, presumivelmente lipídeos (Figura 14 A, C, E). Os grupos que não foram expostos ao CFA (C, SS, ST), apresentaram



arquitetura normal dos tecidos da ATM, sem sinais inflamatórios (Figura 14 B, D, F). Os escores de inflamação foram mais altos nos grupos dor comparados aos grupos controle. Não houve efeito do tratamento com ETCC na análise histológica (Tabela 1, figura X).



**Figura 14: Análise histológica da ATM.** Hematoxilina e eosina (40X). Os círculos indicam acúmulo de infiltrado mononuclear (macrófagos, neutrófilos e linfócitos). **A:** grupo controle total (C); **B:** Salina- Sham-ETCC (SS) **C:** Salina- ETCC (ST); **D:** Dor Orofacial (O); **E:** Dor Orofacial-Sham ETCC (OS); **F:** Dor Orofacial- ETCC (OT). Os círculos indicam infiltrado mononuclear (macrófagos, neutrófilos e linfócitos). **D,E,F:** dano severo à articulação com aumento da inflamação na área retrodiscal. **A, B, C:** ATM com arquitetura normal.

<b>Grupo</b>	<b>Escore (Mediana + min;máx.)</b>
C	0(0;0) <sup>a</sup>
SS	0(0;0) <sup>a</sup>
ST	0(0;0) <sup>a</sup>
O	3(2;3) <sup>b</sup>
OS	3(3;3) <sup>b</sup>
OT	3(2;3) <sup>b</sup>

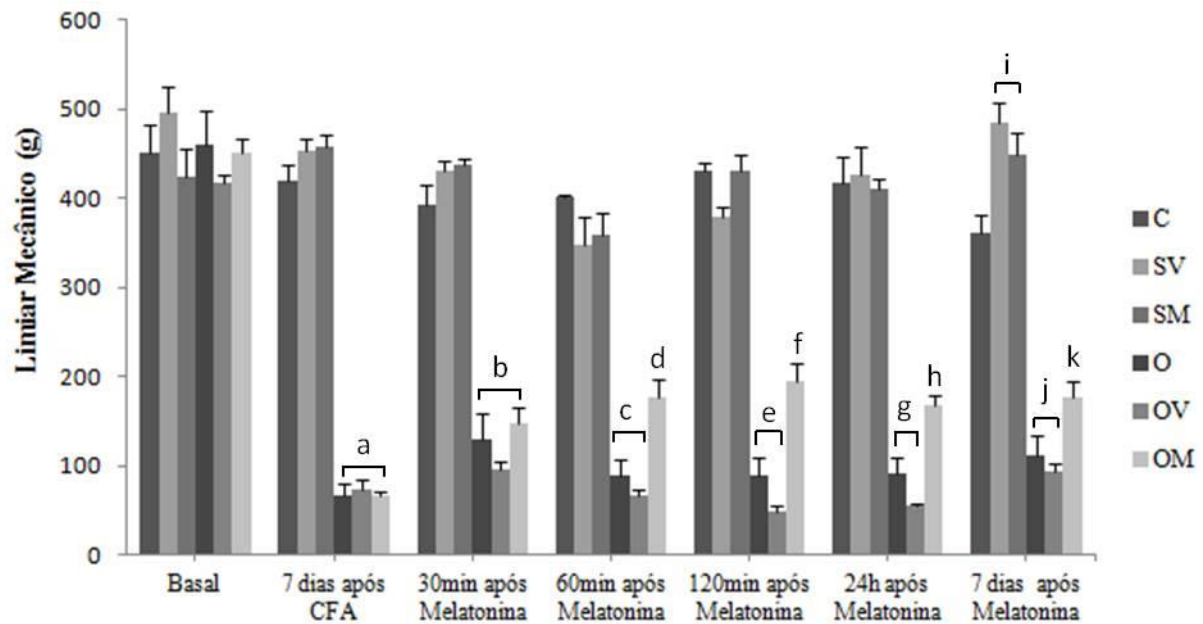
**Tabela 1. Escores histológicos:** escores baseados no sistema usado por Laste et al., 2013 de acordo com acordo a porcentagem de infiltrado mononuclear: 0= ausente, 1=leve (1-10%), 2= moderado (11-50%), 3=severa (51-100%). Diferenças estatisticamente significativas foram designadas por letras diferentes (a,b) . Kruskal-Wallis  $P < 0.05$ ; n= 3-5.

## 6.2 Protocolo 2

### 6.2.1 Comportamento Nociceptivo

#### 6.2.1.1 Hiperalgisia Mecânica (Teste de von Frey Facial)

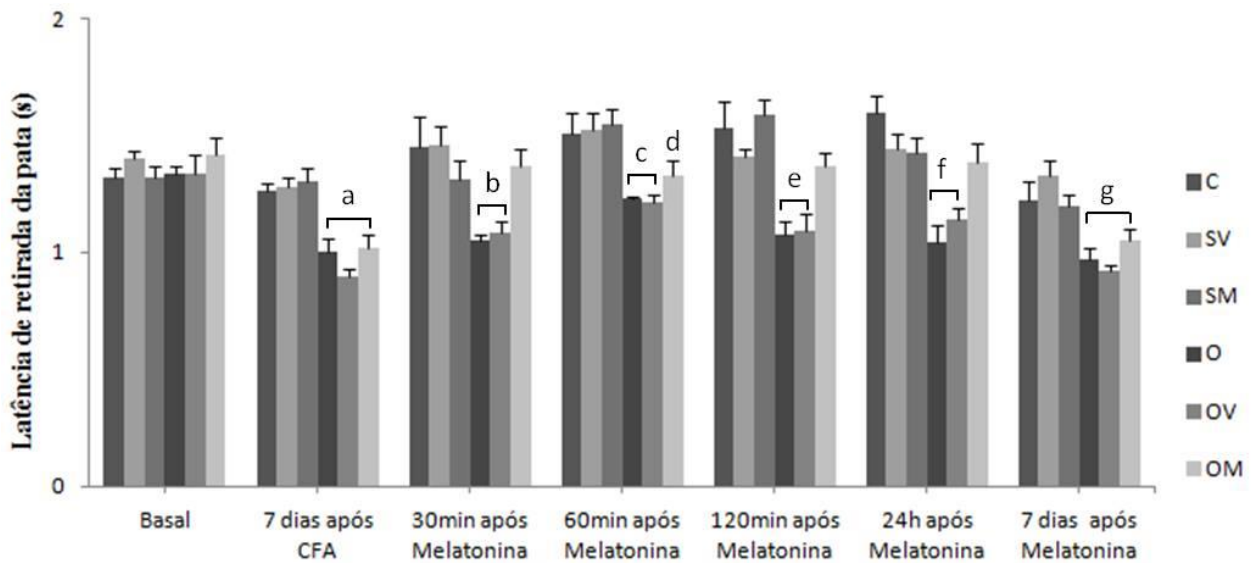
No teste de von Frey facial, a análise estatística mostrou interação entre as variáveis tempo x grupo (GEE: Wald  $\chi^2 = 2.03; 29, P < 0.001$ ). A dor orofacial induziu resposta hiperalgésica que foi parcialmente revertida pela administração aguda melatonina, este resultado pode ser observado até o sétimo dia após o tratamento (Figura 15).



**Figura 15: Efeito da melatonina na resposta hiperalgésica mecânica**, teste de von Frey facial. Dados expressos em Média±EPM (N=33). Grupos controle total (C); Salina-Veículo (SV); Salina-Melatonina (SM); Dor Orofacial (O); Dor Orofacial-Veículo (OV); Dor Orofacial- Melatonina (OM). **a** diferença significativa em relação aos grupos C, SV e SM; **b** diferença significativa em relação aos grupos C, SV e SM; **c** diferença significativa em relação aos grupos C, SV, SM e OM; **d** diferença significativa em relação aos grupos C, SV, SM, O e OV; **e** diferença significativa em relação aos grupos C, SV, SM e OM; **f** diferença significativa em relação aos grupos C, SV, SM, O e OV; **g** diferença significativa em relação aos grupos C, SV, SM e OM; **h** diferença significativa em relação aos grupos C, SV, SM, O e OV; **i** diferença significativa em relação aos grupos C, O, OV e OM; **j** diferença significativa em relação aos grupos C, SV, SM e OM; **k** diferença significativa em relação aos grupos C, SV, SM, O e OV. GEE: Wald  $\chi^2=29,456,31;29$ ,  $P<0.001$ .

### 6.2.1.2 Hiperalgesia Térmica (Teste da Placa Quente)

No teste da placa quente foi observada interação entre as variáveis tempo x grupo (Wald  $\chi^2=6.04;27$ ,  $P<0.001$ ). Os animais expostos ao modelo de dor apresentaram diminuição na latência de retirada da pata. A melatonina aumentou este tempo e manteve este efeito até 24 h após a administração, este resultado não foi observado no último período observado (sete dias após a administração) (Figura 16).

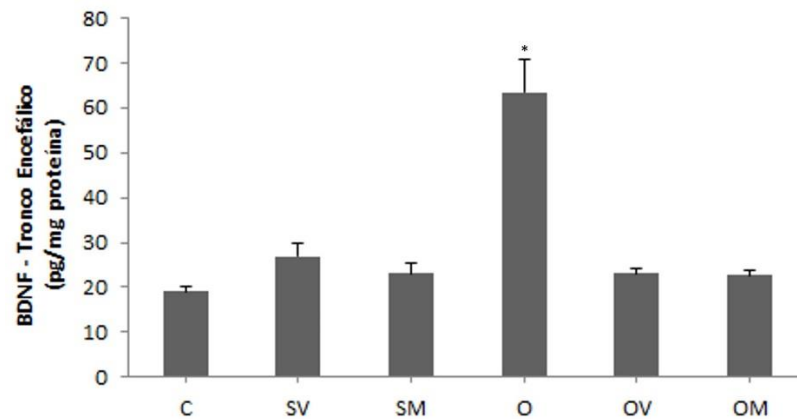


**Figura 16: Efeito da melatonina na resposta hiperalgésica térmica**, teste da placa quente. Dados expressos em Média±EPM (N=33). Grupos controle total (C); Salina-Veículo (SV); Salina-Melatonina (SM); Dor Orofacial (O); Dor Orofacial-Veículo (OV); Dor Orofacial- Melatonina (OM). **a** diferença significativa em relação aos grupos C, SV e SM; **b** diferença significativa em relação aos grupos C, SV, SM e OM; **c** diferença significativa em relação aos grupos C, SV, SM e OM; **d** diferença significativa em relação aos grupos C, SV, SM, O e OV; **e** diferença significativa em relação aos grupos C, SV, SM e OM; **f** Diferente de C, SV, SM e OM; **g** diferença significativa em relação aos grupos C, SV e SM. (GEE: Wald  $\chi^2=6.04;27, P<0.001$ ).

## 6.2.2 Análises Bioquímicas

### 6.2.2.1 Níveis de BDNF

Os animais expostos ao modelo de dor apresentaram aumento nos níveis de BDNF em tronco encefálico quatorze dias após a indução do modelo. Estes níveis foram revertidos nos grupos tratados com melatonina ou veículo (etanol 1%), sugerindo um efeito do álcool sobre este parâmetro (ANOVA de uma via,  $F_{(5,30)}=27.35, P<0.01$ ) (Figura 17). É importante destacar que este efeito não foi observado nos grupos controle e salina (C, SV e SM), sugerindo que o efeito do álcool sobre os níveis de BDNF em tronco encefálico é dependente do estado basal do animal.

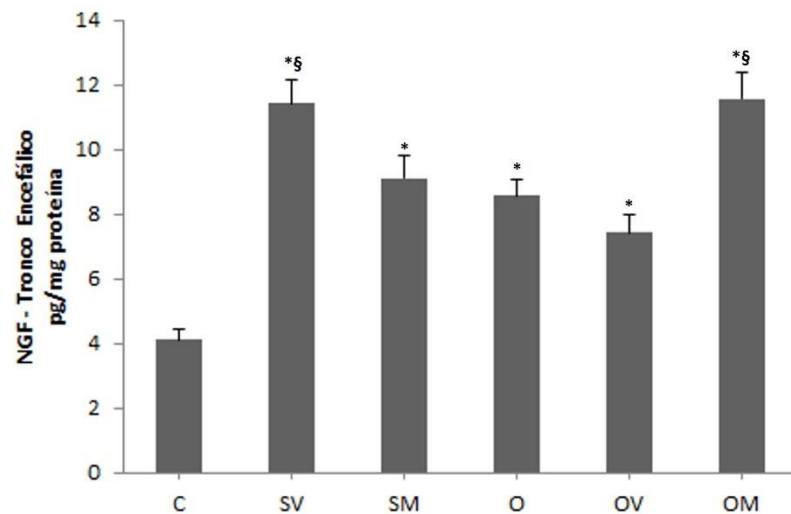


**Figura 17: Níveis de BDNF em tronco encefálico.** Dados expressos em Média±EPM (N=36). Grupos controle total (C); Salina-Veículo (SV); Salina-Melatonina (SM); Dor Orofacial (O); Dor Orofacial-Veículo (OV); Dor Orofacial- Melatonina (OM). \* diferença significativa em relação aos demais grupos, sete dias após o tratamento (ANOVA de uma via/SNK,  $F_{(5,30)}=27.35$ ,  $P<0.01$ ).

#### 6.2.2.2 Níveis de NGF

Os níveis de NGF em tronco encefálico foram aumentados nos animais submetidos ao modelo de dor (grupos O, OV e OM), efeito semelhante foi observado nos animais dos grupos salina (SV e SM) que receberam tratamento com veículo ou melatonina (ANOVA de uma via/SNK,  $F_{(5,26)}=18.01$ ,  $P<0.01$ ), sugerindo efeito do álcool nestes animais, destacando o aumento pronunciado nos animais do grupo salina-veículo (SV). (Figura 18).

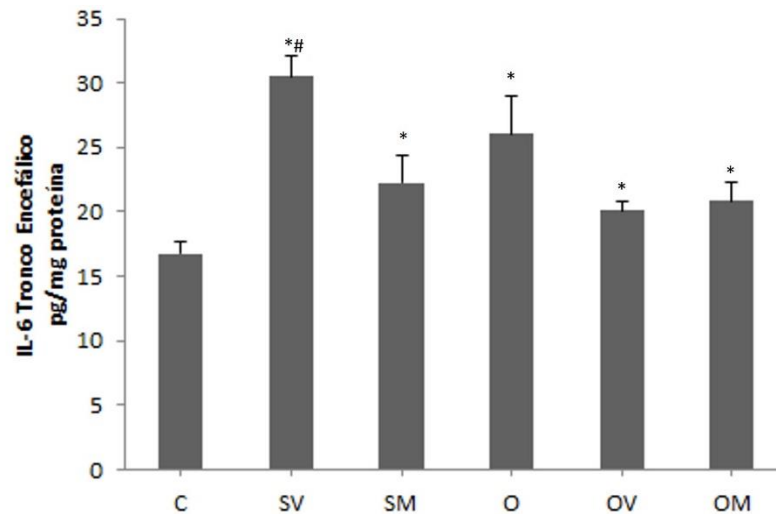




**Figura 18: Níveis de NGF em tronco encefálico.** Dados expressos em Média±EPM (N=32). Grupos controle total (C); Salina-Veículo (SV); Salina-Melatonina (SM); Dor Orofacial (O); Dor Orofacial-Veículo (OV); Dor Orofacial- Melatonina (OM). \* diferença significativa em relação ao grupo controle (C), sete dias após o tratamento; § diferença significativa em relação aos grupos C, SM, O e OV. (ANOVA de uma via/SNK,  $F_{(5,26)}=18.01$ ,  $P<0.01$ ).

### 6.2.2.3 Níveis de IL-6

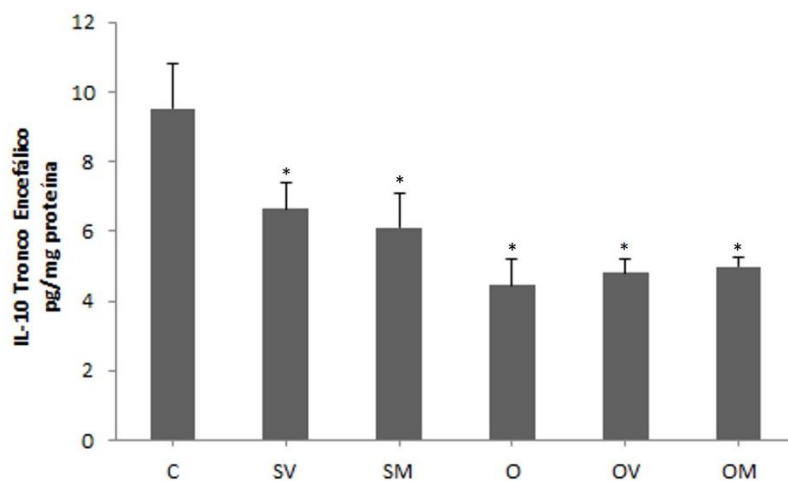
Um aumento nos níveis de IL-6 foi observado nos animais submetidos ao modelo de dor orofacial (O, OV e OM) e nos animais dos grupos salina (SV e SM) tratados com melatonina ou veículo (ANOVA de uma via/SNK,  $F_{(5,26)}=6.39$ ,  $P<0.01$ ). Podemos sugerir que os efeitos observados, tanto do modelo de dor, quanto do veículo, sobre os níveis de IL-6 em tronco encefálico foram dependentes do estado basal do animal, uma vez que nos animais dos grupos dor (O, OV e OM) não foi observado efeito do tratamento enquanto que nos animais dos grupos salina, SM foi diferente do controle, e SV foi diferente de CT, SM, OV e OM (Figura 19).



**Figura 19: Níveis de IL-6 em tronco encefálico.** Dados expressos em Média±EPM (N=32). Grupos controle total (C); Salina-Veículo (SV); Salina-Melatonina (SM); Dor Orofacial (O); Dor Orofacial-Veículo (OV); Dor Orofacial- Melatonina (OM). \* diferença significativa em relação ao grupo controle (C), sete dias após o tratamento; # diferença significativa em relação aos grupos CT, SM, OV e OM sete dias após o tratamento (ANOVA de uma via/SNK,  $F_{(5,26)}=6.39$ ,  $P<0.01$ ).

#### 6.2.2.4 Níveis de IL-10

Os níveis de IL-10 em tronco encefálico foram significativamente reduzidos nos grupos submetidos ao modelo de dor orofacial e nos animais sham tratados com melatonina ou veículo (ANOVA de uma via/SNK,  $F_{(5,29)}=5.34$ ,  $P<0.01$ ). Semelhantemente aos demais biomarcadores analisados neste estudo, o efeito da IL-10 também foi dependente do estado basal do animal. Nos animais submetidos ao modelo de dor não foi observado efeito do tratamento, enquanto que nos animais dos grupos sham observou-se efeito do veículo da melatonina (etanol 1%) (Figura 20).



**Figura 20: Níveis de IL-10 em tronco encefálico.** Dados expressos em Média±EPM (N=35). Grupos controle total (C); Salina-Veículo (SV); Salina-Melatonina (SM); Dor Orofacial (O); Dor Orofacial-Veículo (OV); Dor Orofacial- Melatonina (OM). \* diferença significativa em relação ao grupo controle (C), sete dias após o tratamento; (ANOVA de uma via/SNK,  $F_{(5,29)}=5.34$ ,  $P<0.01$ ).



## **7 DISCUSSÃO**

## 7 DISCUSSÃO

### 7.1 Discussão Protocolo 1

Este é um estudo inovador que introduz o tratamento com ETCC como opção não farmacológica para o tratamento de dor crônica inflamatória orofacial. A ETCC foi capaz de reverter as respostas hiperalgésicas mecânica e térmica em um modelo de disfunção temporomandibular. Além disso, nossos resultados mostram um efeito cumulativo da ETCC indexado pelo aumento do limiar nociceptivo avaliado sete dias após o final do tratamento. Este resultado em longo prazo complementa os resultados obtidos em estudos prévios de nosso grupo, que observaram efeito analgésico da ETCC até 24h após a última aplicação de ETCC (Spezia Adachi et al., 2012; Laste et al., 2012). É importante salientar que o modelo utilizado para induzir a dor orofacial mostrou-se eficaz e persistiu por 21 dias após a injeção com CFA, corroborado pela análise histológica da ATM, bem como por estudos prévios que apresentam infiltrado de células mononucleares e vacúolos lipídicos abundantes (Wang et al., 2012). Destacamos que, apesar do tratamento com ETCC reduzir a resposta hiperalgésica dos ratos, nenhum efeito desta técnica foi observado na análise histológica do processo inflamatório na ATM.

Sabe-se que os testes comportamentais utilizados neste estudo envolvem diferentes circuitos supra espinhais, e que a literatura indica que a ETCC pode ativar áreas neurais envolvidas com o processamento da dor como tálamo e tronco encefálico, ativando vias descendentes e levando ao alívio da dor por meio de um mecanismo de modulação *top-down* (Lima e Fregni, 2008; Spezia Adachi et al., 2015). Nossos resultados mostram que aplicação não invasiva por corrente contínua exerce um efeito antinociceptivo observado na periferia.

Os mecanismos modulatórios exercidos pela ETCC em circuitos supra espinhais são pouco esclarecidos. O princípio básico da ETCC consiste na utilização de uma corrente elétrica de baixa intensidade aplicada sobre o escalpo por meio de eletrodos (anódico e catódico). O tipo de estimulação aplicada determina o efeito do tratamento, a estimulação anódica tipicamente aumenta a excitabilidade do potencial de repouso de membrana (Rosen et al., 2009). A ETCC é uma técnica de estimulação não focal e não restrita a uma área específica do cérebro, especialmente em pequenos animais (Spezia Adachi et al., 2015). No entanto, regiões corticais como o córtex motor primário (M1) e o córtex pré-frontal dorsolateral (DLPFC) tem sido alvo da ETCC devido a suas diferentes atividades que incluem detecção, percepção e modulação da informação nociceptiva (Quevedo e Coghill, 2007; Silvetti et al., 2014). O efeito *top-down* da ETCC envolve projeções para áreas como substância cinzenta periaquedutal (Lima e Fregni, 2008), tálamo, tronco encefálico e medula espinhal (Heinricher et al., 2009; Spezia Adachi et al., 2015).

Adicionalmente, observou-se o efeito da ETCC e do modelo de dor sobre o perfil de citocinas e fatores neurotróficos tanto periférica quanto centralmente (BDNF, NGF, IL-6 e IL-10). Neste estudo, observou-se níveis elevados de BDNF em tronco encefálico dezesseis dias após a indução do modelo de dor. Esta neurotrofina tem sido relacionada à sensibilidade dolorosa (Zhang et al., 2013). Guo e colaboradores (2006) sugerem que a cascata iniciada pela ligação BDNF-TrkB no bulbo ventromedial rostral está envolvida com a dor persistente após inflamação.

Além disso, o BDNF está envolvido com a diminuição da regulação do co-transportador  $K^+-Cl^-$  ( $KCC_2$ ) que é responsável pela manutenção do gradiente de  $Cl^-$  em sinapses inibitórias gabaérgicas, resultando em diminuição da inibição gabaérgica com consequente facilitação da dor (Zhang et al., 2013). Os resultados descritos nesta tese mostram que a ETCC foi capaz de reverter totalmente o aumento dos níveis de BDNF em tronco encefálico induzido pelo modelo de dor, corroborando estudos prévios de nosso grupo que mostram que a ETCC reduziu os níveis de BDNF

em medula espinhal e tronco encefálico de animais submetidos ao modelo de hiperalgesia induzida por estresse crônico (Spezia Adachi et al., 2015).

Por outro lado, a avaliação dos níveis de NGF, uma neurotrofina importante na dor crônica (Wong et al., 2014), evidenciou que a ETCC não foi capaz de reverter o aumento nos níveis de NGF induzidos pelo modelo de dor no tronco encefálico. O efeito do NGF central na hiperalgesia é evidente, estudos prévios destacam o aumento destes níveis em fluido cérebro-espinhal de pacientes com cefaleia crônica (Sarchielli et al., 2001). Adicionalmente, a infusão de NGF intracerebroventricular promove comportamento do tipo nociceptivo em ratos (Hao et al., 2000). No entanto, há poucos estudos que relacionam técnicas neuromodulatórias e neurotrofinas como o NGF em modelos de dor crônica orofacial.

Nossos resultados incluem a análise de mediadores inflamatórios entre eles a IL-10 e a IL-6. Os níveis de IL-10 no tronco encefálico apresentaram-se aumentados sete dias após o final do tratamento com ETCC em relação aos níveis observados em 24 h após o tratamento. A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória liberada na fase de resolução do processo inflamatório prevenindo danos teciduais (Ouyang et al., 2011; Tabas e Glass, 2013). Ela atua sobre células do sistema imune diminuindo a liberação de citocinas pró inflamatórias como IL-1 e TNF-  $\alpha$  (Haddad et al., 2003). Nosso resultado apresentado nas 24 h após a última sessão de ETCC corrobora estudos prévios que mostram um desequilíbrio entre citocinas pró e anti-inflamatórias estimulando a micróglia a produzir mais mediadores pró-inflamatórios, que por sua vez podem desencadear um processo de neuroinflamação e conseqüentemente neurodegeneração (Qin et al., 2007). Um estudo prévio mostrou que a injeção de IL-10 no subnúcleo caudal do complexo trigeminal reduziu a hiperalgesia induzida por injeção de CFA no músculo masseter (Shimizu et al., 2009). Então, nós sugerimos que o comportamento dos níveis desta citocina varia com o decurso temporal após a injeção de CFA.

Em relação aos níveis de IL-6, observamos que houve um aumento no grupo submetido ao modelo de dor orofacial (O). Esta citocina possui efeito pró inflamatório e regulatório em diferentes locais como tecidos neurais, células imunes (T e B), macrófagos, fibroblastos, micróglia e astrócitos. Ela é rapidamente induzida durante a inflamação aguda associada com trauma, infecção e morte neuronal (Eliav et al., 2009; Song e Kellum, 2005). Sabe-se que entre as funções da IL-6 está a síntese de NGF (Song e Kellum, 2005), e no presente estudo nós observamos que houve aumento significativo de NGF e IL-6 no tronco encefálico dos animais submetidos ao modelo de dor orofacial. No entanto, estes níveis foram reduzidos pelo sham da ETCC e pelo tratamento efetivo com ETCC, sugerindo que a aplicação de ETCC por apenas 30s (sham ETCC) foi capaz de alterar estes parâmetros.

Adicionalmente, foram realizadas análises periféricas de BDNF, NGF, IL-10 e IL-6 em soro. O principal efeito observado foi a interação dor orofacial x tempo nos níveis BDNF, evidenciando que estes níveis retornaram aos valores basais sete dias após a última sessão do tratamento. Um estudo envolvendo pacientes com síndrome de sensibilização central mostrou elevados níveis séricos de BDNF comparado aos níveis encontrados em pacientes com síndrome, porém sem o componente de sensibilização central, sugerindo este mediador de neuroplasticidade como um indicador periférico de alterações centrais nestes pacientes (Deitos et al., 2015).

Algumas limitações devem ser consideradas em nosso estudo. Os animais do grupo salina-ETCC receberam estimulação ativa durante 30 segundos para simular o que é realizado em pesquisas que envolvem ETCC em humanos. Entretanto, esta curta aplicação em uma pequena área como a cabeça do rato pode levar a modulação de áreas remotas do neuroeixo como observado nos níveis de IL-6 em tronco encefálico em que 24 h após o final do tratamento o grupo dor- sham-ETCC (OS) apresentou redução nos níveis de IL-6. Estas alterações foram estado-dependente uma vez que animais dos grupos sham do modelo de dor não exibiram este efeito do sham-ETCC.

Em resumo, nós demonstramos que a ETCC foi um método eficiente no alívio da dor inflamatória a curto, médio e longo prazo. A ETCC alterou níveis de mediadores neuroimunomodulatórios (BDNF e IL-6) em modelo de dor crônica orofacial sugerindo que múltiplos mecanismos fisiológicos estejam envolvidos nos efeitos da ETCC sobre o processo nociceptivo.

## **7.2 Discussão Protocolo 2**

Neste estudo nós demonstramos que a administração aguda de melatonina reverteu parcialmente a hiperalgesia mecânica e térmica induzida pelo modelo de dor orofacial (disfunção temporomandibular). É importante destacar que o efeito da melatonina sobre a hiperalgesia mecânica permaneceu por até sete dias após a sua administração. Além disso, nós observamos alterações nos níveis de neurotrofinas ligados a condições de dor e/ou ao efeito da melatonina e seu veículo (BDNF, NGF, IL-6 e IL-10) em tronco encefálico.

O modelo de dor inflamatória induzido por CFA é amplamente utilizado no teste de fármacos analgésicos, incluindo aqueles com propriedade anti-inflamatória (Yamasaki et al., 2008; Kim et al., 2015; Laste et al., 2015). Em nosso estudo, o modelo de DTM provocou comportamento nociceptivo por até quinze dias após a indução da dor. O dano tecidual causado pela injeção de CFA leva a liberação de uma gama de mediadores inflamatórios, aumenta os níveis de citocinas e radicais livres (Maleki et al., 2001). Este acúmulo de mediadores inflamatórios sensibiliza neurônios nociceptivos, aumenta a excitabilidade neuronal e leva a hiperalgesia secundária (Zaringhalam et al., 2013).

O efeito antinociceptivo exibido pela melatonina neste estudo corrobora estudos prévios de nosso grupo que demonstraram a eficácia da melatonina em reverter comportamento nociceptivo de animais submetidos a um modelo de inflamação crônica na pata (Laste et al., 2012; 2015). Este

efeito apresenta plausibilidade biológica suportada pela presença de receptores melatoninérgicos em diferentes áreas do sistema nervoso central envolvidas com a nocicepção como tálamo, hipotálamo, corno dorsal da medula espinhal e núcleos trigeminais (Srinivasan et al., 2012). Evidências experimentais sugerem que o efeito analgésico da melatonina é mediado por diferentes sistemas como o sistema opioide, o glutamatérgico, pela via do óxido nítrico, entre outros (Ambriz-Tututi et al., 2009). Além disso, este efeito é bloqueado pela administração de antagonistas opioides e melatoninérgicos, e por agonistas NMDA (Srinivasan et al., 2012). Por outro lado, sugere-se que modulação periférica ocorra por meio da inibição das enzimas cicloxigenases e óxido nítrico sintase (Wang et al., 2009).

Adicionalmente, nós mostramos que o modelo de DTM induziu aumento nos níveis de BDNF em tronco encefálico. Esta neurotrofina exerce um papel significativo na regulação da dor inflamatória e na hiperalgesia secundária (Zhao et al., 2006). BDNF tem sido citado como modulador nos processos nociceptivos, principalmente, devido a sua capacidade de modular receptores do tipo NMDA (Merighi et al., 2008). Tao e colaboradores (2014) mostraram *up-regulation* do gene de BDNF e aumento na distribuição de receptores glutamatérgicos em tronco encefálico de ratos submetidos a um modelo de dor inflamatória. Além disso, BDNF está envolvido nas fases de indução e manutenção da potenciação de longa duração (LTP) (Caldeira et al., 2007; Filho et al., 2015; Spezia Adachi et al., 2015).

Por outro lado, em nosso estudo o aumento nos níveis de BDNF foi revertido nos grupos tratados com melatonina ou com seu veículo, sete dias após o tratamento sugerindo um efeito modulatório do álcool (etanol 1%) utilizado como veículo. No entanto, nem veículo nem melatonina apresentaram efeito nos grupos salina (sem dor) sugerindo que o efeito observado foi dependente do estado basal do animal. A literatura mostra que níveis reduzidos de BDNF-RNA foram observados em hipocampo, amígdala e córtex frontal de ratos submetidos a uma

administração aguda de etanol (Raivio et al., 2012). Considerando que estudos prévios mostraram relação entre BDNF e sistema gabaérgico, nós sugerimos que a redução nos níveis de BDNF exibidos em nossos resultados pode estar ligado a um aumento na transmissão gabaérgica induzida pela administração do álcool como veículo (Kumar et al., 2009). No entanto, nossas análises envolvem a estrutura completa (tronco encefálico) sem considerar subdivisões anatômicas como Raivio et al. (2012) que mostraram elevados níveis de BDNF na área tegmentar ventral após administração aguda de etanol. De qualquer forma, nossos resultados apontam para um efeito modulador significativo de uma única administração de etanol pelo menos até sete dias após sua injeção.

Nós observamos também os níveis aumentados de NGF em tronco encefálico dos animais submetidos a modelo de orofacial. Este resultado corrobora estudo de Jing et al. (2009) que encontraram níveis aumentados de NGF no núcleo rubro de animais submetidos a um modelo de dor neuropática. Outro estudo mostrou aumento na imunorreatividade do receptor NGF-TrkA na medula espinhal de animais submetidos ao modelo de artrite induzida por CFA, suportando a hipótese de envolvimento de NGF na plasticidade neuronal associada a dor crônica (Pezet et al., 1999). É importante destacar que em nosso estudo também foi observado um aumento nos níveis de NGF nos animais tratados com melatonina ou veículo (grupos SS, SM e OM). Isto nos permite dizer que nos níveis de NGF em tronco encefálico, a ação da melatonina e de seu veículo foi dependente do estado basal do animal, uma vez que nos animais com dor não houve diferença entre os grupos O e OV, enquanto que no grupo dor tratado com melatonina (OM) houve um aumento significativamente maior. Nos grupos Sham (SV e SM), ambos apresentaram aumento nos níveis de NGF quando comparados com o grupo controle, sugerindo um efeito do etanol 1% utilizado como veículo. Entretanto, a melatonina (grupo SM) reduziu o aumento induzido pelo veículo, porém sem retornar ao nível do grupo controle.



Nossos resultados ressaltam que uma única administração de etanol pode levar a efeitos neuromodulatórios. Wang et al. (2010) também demonstraram alterações nos níveis centrais de NGF via *up regulation* do sistema NGF/TrkA no cerebelo de animais expostos a etanol. De acordo com nossos achados é possível afirmar que a dor crônica altera níveis centrais de NGF, e sugerir que o NGF participa de eventos plásticos que podem estar ligados a resposta do sistema nervoso central ao dano causado pelo etanol. A melatonina não foi capaz de reverter o aumento nos níveis de NGF, porém, um estudo de Coiro e Vescovi (1998) demonstrou que as funções fisiológicas da melatonina são reduzidas em alcoólicos.

Nós observamos um aumento nos níveis de IL-6 no tronco encefálico dos animais expostos ao modelo de dor orofacial. Este aumento também foi observado nos animais do grupo Sham tratados com melatonina ou veículo (SS e SM). Mais uma vez ressaltamos que os efeitos da melatonina e do veículo foram dependentes do estado basal do animal, uma vez que os tratamentos não exerceram efeito nos animais dos grupos dor (todos os grupos responderam semelhantemente – O, OV e OM), mas houve diferença entre os animais dos grupos Sham: grupo SM foi diferente do grupo controle; e grupo SV foi diferente dos grupos CT, SM, OV e OM, afirmamos seguramente efeito do etanol 1% utilizado como veículo. Assim, uma única administração de álcool nos animais Sham foi suficiente para modificar níveis centrais de IL-6 sete dias após a administração.

A IL-6 é uma citocina pró inflamatória presente em elevadas concentrações no fluido sinovial de ATMs com algum tipo de disfunção. Em combinação com outras citocinas, a IL-6 promove degradação óssea e cartilaginosa das articulações (Campos et al., 2006). Além disso, IL-6 apresenta um papel central na defesa do hospedeiro e pode ser produzida por diferentes tipos celulares como monócitos/macrófagos, células T, fibroblastos e células endoteliais. Nossos resultados foram analisados em estrutura central (tronco encefálico) e corroboram estudo prévio

que afirma que citocinas pró inflamatórias apresentam diferentes efeitos no SNC entre elas hiperalgesia e comportamento nociceptivo (Heffner et al., 2011).

Seguindo com as análises de citocinas nós observamos uma redução nos níveis de IL-10 nos animais submetidos ao modelo de dor orofacial com e sem tratamento. É importante salientar que esta diminuição foi observada também nos animais dos grupos Sham (SV e SM), sugerindo, mais uma vez, efeito estado- dependente do veículo (etanol 1%), visto que não foi observado este efeito nos animais dos grupos dor (O, OV e OM não foram diferentes entre si), mas animais sham apresentaram diminuição semelhante nos níveis de IL-10. É fundamental destacar que a IL-10 é uma citocina central liberada durante a fase de resolução do processo inflamatório que previne os danos teciduais decorrentes de traumas ou infecções (Ouyang et al., 2011; Schunk et al., 2015). No entanto, neste estudo nós utilizamos um modelo de dor crônica orofacial (DTM) induzido pela injeção intra-articular de CFA. Estudos prévios envolvendo CFA e DTM demonstraram presença persistente de processo inflamatório por até seis semanas após a injeção com CFA em ratos (Spears et al., 2005; Nascimento, Leite-Panissi, 2014). Então, nós sugerimos que os níveis reduzidos de IL-10 observados em nosso estudo possam estar relacionados ao fato de o processo ainda estar distante da fase de resolução. Assim, acredita-se que tanto a dor crônica quanto a exposição ao álcool criam um desequilíbrio no processo homeostático, dificultando o reparo dos efeitos induzidos por estes processos (Ouyang et al., 2011; Tabas e Glass, 2013).

Em resumo, este estudo avaliou o perfil de citocinas e nurotrofinas ligados à condição de dor crônica orofacial. Entretanto, surpreendentemente, nossas análises mostraram alterações nestes marcadores decorrentes tanto do processo de dor, como da exposição a melatonina e ao etanol 1% utilizado como veículo. Nós sugerimos que efeitos da melatonina e de seu veículo foram dependentes do estado basal do animal uma vez que a resposta ao tratamento diferiu entre animais dos grupos dor e animais dos grupos Sham. Embora o efeito exercido pelo veículo da melatonina

tenha sido uma limitação em nosso estudo, este foi um dado farmacológico importante, pois foi possível mostrar que uma única administração de álcool é capaz de exercer efeitos modulatórios no SNC em longo prazo.

Por fim, nosso estudo aponta a melatonina como uma opção farmacológica para tratamento das dores crônicas orofaciais. No entanto, mais estudos são necessários para esclarecimento de seus efeitos farmacológicos.

## **8 CONCLUSÕES**

## 8 CONCLUSÕES

Ambos os tratamentos testados neste estudo (estimulação transcraniana por corrente contínua – ETCC e melatonina) foram capazes de reduzir as respostas hiperalgésicas mecânica e térmica induzidas pelo modelo de dor crônica orofacial (disfunção temporomandibular). Além disso, demonstrou-se que o modelo de dor crônica orofacial foi capaz de alterar citocinas e neurotrofinas em nível central quinze dias após a sua indução, confirmando o papel destes moduladores nas alterações decorrentes dos processos de dor crônica.

Considerando as limitações dos tratamentos padrão administrados em dor crônica, apresentamos duas opções terapêuticas que exibiram efeito antinociceptivo. No entanto, este foi um estudo inicial de fase pré-clínica que suscita a necessidade de mais estudos para a compreensão dos efeitos farmacológicos tanto da ETCC quanto da melatonina.

**9 PERSPECTIVAS**

## 9 PERSPECTIVAS

Para investigar possíveis efeitos periféricos dos tratamentos aplicados neste estudo serão realizadas medidas de sistemas antioxidantes e de estresse oxidativo: Glutathione Total e Reduzida (GSH), Catalase (CAT), medida de peróxido de hidrogênio e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em osso (ATM).

Em estudos futuros esperamos compreender participação de sistemas envolvidos na modulação da dor orofacial como o sistema opioide por meio da quantificação de receptores  $\mu$  por técnica de *Western Blot* em gânglio trigeminal e tronco cerebral.

Além disso, objetivamos desenvolver estudos para a avaliação de possíveis vias envolvidas na dor inflamatória orofacial e no tratamento com ETCC e melatonina como a via glutamatérgica e opioidérgica por meio de administração de antagonistas e agonistas de receptores envolvidos com estas vias.

**10 REFERÊNCIAS**



## 10 REFERÊNCIAS

1. Ambriz-Tututi M, Rocha-González HI, Cruz SL, Granados-Soto V. Melatonin: a hormone that modulates pain. *Life Sci.* 2009; 84(15-16): 489-498.
2. Ambriz-Tututi M, Granados-Soto V. Oral and spinal melatonin reduces tactile allodynia in rats via activation of MT2 and opioid receptors. *Pain.* 2007; 132 (3): 273–280,
3. Alstergren P. Cytokines in temporomandibular joint arthritis. *Oral Dis.* 2000; 6(6): 331-334.
4. American Society of Anesthesiologists Task Force on Chronic Pain Management; American Society of Regional Anesthesia and Pain Medicine. Practice guidelines for chronic pain management: an updated report by the American Society of Anesthesiologists Task Force on Chronic Pain Management and the American Society of Regional Anesthesia and Pain Medicine. *Anesthesiology*, v. 112, no. 4, p. 810-833, 2010.
5. Antal A, Terney D, Kühnl S, Paulus W. Anodal transcranial direct current stimulation of the motor cortex ameliorates chronic pain and reduces short intracortical inhibition. *J Pain Symptom Manage.* 2010; 39(5): 890-903.
6. Arendt J, Skene DJ. Melatonin as a chronobiotic. *Sleep Med Rev.* 2005; 9(1): 25-39.
7. Arreola-Espino R, Urquiza-Marín H, Ambriz-Tututi M, Araiza-Saldaña CI, Caram-Salas NL, Rocha-González HI, Mixcoatl-Zecuatl T, Granados-Soto V. Melatonin reduces formalin-induced nociception and tactile allodynia in diabetic rats. *Eur J Pharmacol.* 2007; 577: 203–210.
8. Attal N, Cruccu G, Haanpää M, Hansson P, Jensen TS, Nurmikko T, Sampaio C, Sindrup S, Wiffen P; EFNS Task Force. EFNS guidelines on pharmacological treatment of neuropathic pain. *Eur J Neurol.* 2006; 13(11): 1153-1169.

9. Basbaum AI, Jessell TM. The perception of pain. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. Eds. Principles of neural science. Fourth edition McGraw-Hill. P. 472-491. New York. 2000.
10. Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. Cellular and Molecular Mechanisms of pain. *Cell*. 2009; 139(2): 267-284.
11. Bickler PE, Fahlman CS. The inhaled anesthetic, isoflurane, enhances  $Ca^{+2}$  dependent survival signaling in cortical neurons and modulates MAP kinases, apoptosis proteins and transcription factors during hypoxia. *Anesth Analg*. 2006; 10(3):419-429.
12. Bindman LJ, Lippold OC, Redfearn JW. The action of brief polarizing currents on the cerebral cortex of the rat (1) during current flow and (2) in the production of long-lasting after effects. *J Physiol*. 1964; 172: 369-382
13. Blyth F. Chronic pain- is it a public health problem? *Pain* 2008; 137(3):465-466.
14. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976; 72: 248-254.
15. Brunoni AR, Zanao TA, Vanderhasselt MA, Valiengo L, de Oliveira JF, Boggio PS, Lotufo PA, Benseñor IM, Fregni F. Enhancement of affective processing induced by bifrontal transcranial direct current stimulation in patients with major depression. *Neuromodulation*. 2014; 17(2): 138–142.
16. Caldeira MV, Melo CV, Pereira DB, Carvalho RF, Carvalho AL, Duarte CB. BDNF regulates the expression and traffic of NMDA receptors in cultured hippocampal neurons. *Mol Cell Neurosci*. 2007; 35(2):208-219.
17. Campos MIG, Campos PSF, Line SRP. Inflammatory cytokines activity in temporomandibular joint disorders: a review of literature. *Braz J Oral Sci*. 2006; 5(18): 1054-1062.

18. Carvalho WA; Lemonica L. Mecanismos celulares e moleculares da dor inflamatória. Modulação periférica e avanços terapêuticos. *Ver Bras Anesthesiol.* 1998; 48: 137-158.
19. Cesa, M. DTM e Dor Orofacial, Academia Americana de Dores Orofaciais, Sociedade Brasileira de Cefaléia. Disponível em: <http://www.dtmedororofacial.com>.
20. Claustrat B, Brun J, Chazot G. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep Med Rev.* 2005; 9(1): 11-24.
21. Coiro V, Vescovi PP. Alcoholism abolishes the effects of melatonin on growth hormone secretion in humans. *Neuropeptides.* 1998; 32(3): 211-214.
22. Costigan M, Scholz J, Woolf CJ. Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. *Annu Rev Neurosci.* 2009; 32: 1-32.
23. Cuzzocrea S, Zingarelli B, Gilad E, Hake P, Salzman AL, Szabó C. Protective effect of melatonin in carrageenan-induced models of local inflammation: relationship to its inhibitory effect on nitric oxide production and its peroxynitrite scavenging activity. *J Pineal Res.* 1997; 23(2): 106-116.
24. Deitos A, Dussán-Sarria JA, de Souza A, Medeiros L, da Graça Tarragô M, Sehn F, Chassot M, Zanette S, Schwertner A, Fregni F, Torres IL, Caumo W. Clinical Value of Serum Neuroplasticity Mediators in Identifying the Central Sensitivity Syndrome in Patients With Chronic Pain With and Without Structural Pathology. *Clin J Pain.* 2015; 31(11): 959-967.
25. Dos Santos JR. Supportive Conservative Therapies for Temporomandibular Disorders. *Dent. Clin. North Am.* 1995; 39(2): 459-477.
26. Dubner R. Neurophysiology of pain. *Dent Clin North Am.* 1978; 22(1): 11-30.
27. Eliav E, Benoliel R, Herzberg U, Kalladka M, Tal M. The role of IL-6 and IL-1beta in painful perineural inflammatory neuritis. *Brain Behav Immun.* 2009; 23(4): 474-484.

28. Esposito E, Paterniti I, Mazzon E, Bramanti P, Cuzzocrea S. Melatonin reduces hyperalgesia associated with inflammation. *J Pineal Res.* 2010; 49: 321–331.
29. Filho PR, Vercelino R, Cioato SG, Medeiros LF, Oliveira Cd, Scarabelot VL, Souza A, Rozisky JR, Quevedo Ada S, Adachi LN, Sanches PR, Fregni F, Caumo W, Torres IL. Transcranial direct current stimulation (tDCS) reverts behavioral alterations and brainstem BDNF level increase induced by neuropathic pain model: Long-lasting effect. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2015; 4;64:44-51.
30. Finnerup NB, Otto M, McQuay HJ, Jensen TS, Sindrup SH Algorithm for neuropathic pain treatment: an evidence based proposal. *Pain.* 2005; 18(3):289-305.
31. Fitzgerald PB, Fountain S, Daskalakis ZJ. A comprehensive review of the effects of rTMS on motor cortical excitability and inhibition. *Clin Neurophysiol.* 2006; 117(12): 2584-2596.
32. Fregni F, Boggio PS, Lima MC, Ferreira MJ, Wagner T, Rigonatti SP, Castro AW, Souza DR, Riberto M, Freedman SD, Nitsche MA, Pascual-Leone A. A sham-controlled, phase II trial of transcranial direct current stimulation for the treatment of central pain in traumatic spinal cord injury. *Pain.* 2006a; 122(1-2):197-209.
33. Fregni F, Gimenes R, Valle AC, Ferreira MJ, Rocha RR, Natalle L, Bravo R, Rigonatti SP, Freedman SD, Nitsche MA, Pascual-Leone A, Boggio PS. A randomized, sham-controlled, proof of principle study of transcranial direct current stimulation for the treatment of pain in fibromyalgia. *Arthritis Rheum.* 2006b; 54(12): 3988-3998.
34. Fregni F, Boggio PS, Nitsche MA, Marcolin MA, Rigonatti SP, Pascual-Leone A. Treatment of major depression with transcranial direct current stimulation. *Bipolar Disord.* 2006c; 8(2):203-204.

35. Fregni F, Pascual-Leone A. Technology insight: noninvasive brain stimulation in neurology-perspectives on the therapeutic potential of rTMS and tDCS. *Nat Clin Pract Neurol*. 2007; 3(7):383-393.
36. Fredriksson L, Alstergren P, Kopp S. Serotonergic mechanisms influence the response to glucocorticoid treatment in TMJ arthritis. *Mediators Inflamm*. 2005; 2005(4): 194-201.
37. Fredriksson L, Alstergren P, Kopp S. Tumor necrosis factor-alpha in temporomandibular joint synovial fluid predicts treatment effects on pain by intra-articular glucocorticoid treatment. *Mediators Inflamm*. 2006; 6(59425): 1-7.
38. Fruhstorfer H, Gross W, Selbmann O. von Frey hairs: new materials for a new design. *Eur J Pain*. 2001; 5(3): 341-342.
39. Garcia JBS, Neto ET. Atividade laboral em pacientes atendidos em um serviço ambulatorial de dor crônica. *Rev Dor. São Paulo*. 2011; 12(3): 215-220.
40. Garcia BT, Vieira EBM, Garcia JBS. Relationship between chronic pain and working activities in patients with painful syndromes. *Rev Dor. São Paulo*. 2013; 14(3): 204-209.
41. Goldberg DS, McGee SJ. Pain as a global public health priority. *BMC Public Health*. 2011; 6(11): 770.
42. Graff-Radford SB, Bassiur JP. Temporomandibular disorders and headaches. *NeurolClin*. 2014; 32(2): 525-537.
43. Greene CS. Managing the care of patients with temporomandibular disorders: anew guideline for care. *J Am Dent Assoc*. 2010; 141:1086–1088.

44. Guo W, Robbins M T, Wei F, Zou S, Dubner R, Ren K. Supraspinal brain-derived neurotrophic factor signaling: a novel mechanism for descending pain facilitation. *J. Neurosci* 2006; 26: 126–137.
45. Haddad JJ, Saade NE, Safieh-Garabedian B. Interleukin-10 and the regulation of mitogen-activated protein kinases: are these signalling modules targets for the anti-inflammatory action of this cytokine? *Cell Signal*. 2003; 15(3): 255-267.
46. Heinricher MM, Tavares I, Leith JL, Lumb BM. Descending control of nociception: specificity, recruitment and plasticity. *Brain Res Rev*. 2009; 60(1): 214–225.
47. Hao J, Ebendal T, Xu X, Wiesenfeld-Hallin Z, EriksdotterJonhagen M. Intracerebroventricular infusion of nerve growth factor induces pain-like response in rats. *Neurosci Lett*. 2000; 286: 208-212.
48. Heffner KL, France CR, Trost Z, Ng HM, Pigeon WR. Chronic low back pain, sleep disturbance, and interleukin-6. *Clin J Pain*. 2011; 27(1): 35-41.
49. Holson RR. Euthanasia by decapitation: evidence that this technique produces prompt, painless unconsciousness in laboratory rodents. *Neurotoxicol Teratol*. 1992; 14(4): 253-257.
50. Huang F, He H, Fan W, Liu Y, Zhou H, Cheng B. Orofacial inflammatory pain affects the expression of MT1 and NADPH-d in rat caudal spinal trigeminal nucleus and trigeminal ganglion. *Neural Regen Res*. 2013; 8(32): 2991-3002.
51. Hutchins B, Spears R, Hinton R, Harper RP. Calcitonin gene-related peptide and substance P immunoreactivity in rat trigeminal ganglia and brainstem following adjuvant-induced inflammation of the temporomandibular joint. *Archives of Oral Biology*. 2000; 45: 335-345.
52. Imbe H, Iwata K, Zhou QQ, Zou S, Dubner R, Ren K. Orofacial deep and cutaneous tissue inflammation and trigeminal neuronal activation. Implications for persistent temporomandibular pain. *Cells Tissues Organs*. 2001; 169(3): 238-247.

53. Ji RR, Kohno T, Moore KA, Woolf CJ. Central sensitization and LTP: do pain and memory share similar mechanisms? *Trends Neurosci.* 2003; 26(12): 696-705.
54. Jing YY, Wang JY, Li XL, Wang ZH, Pei L, Pan MM, Dong XP, Fan GX, Yuan YK. Nerve growth factor of red nucleus involvement in pain induced by spared nerve injury of the rat sciatic nerve. *Neurochem Res.* 2009; 34(9):1612-1618.
55. Jorge L, Rodrigues J, Gouveia M. Disfunção temporomandibular no contexto da dor orofacial. *Rev Dor.* 2014; 22(2):6-12
56. Kim SH, Son CN, Lee HJ, Cho HC, Jung SW, Hur JA, Baek WK, Jung HR, Hong JH. Infliximab partially alleviates the bite force reduction in a mouse model of temporomandibular joint pain. *J Korean Med Sci.* 2015; 30(5):552-558.
57. Kumar S, Porcu P, Werner DF, Matthews DB, Diaz-Granados JL, Helfand S, Morrow AL. The role of GABA (A) receptors in the acute and chronic effects of ethanol: a decade of progress. *Psychopharmacology (Berl).* 2009; 205: 529–564.
58. Lakin MI, Miller CH, Stott ML, Winters WD. Involvement of the pineal gland and melatonin in murine analgesia. *Life Sci.* 1981; 29: 2543-2551.
59. Laste G, Caumo W, Adachi LN, Rozisky JR, de Macedo IC, Filho PR, Partata WA, Fregni F, Torres IL. After-effects of consecutive sessions of transcranial direct current stimulation (tDCS) in a rat model of chronic inflammation. *Exp Brain Res.* 2012; 221(1): 75-83.
60. Laste G, Vidor L, de Macedo IC, Rozisky JR, Medeiros L, de Souza A, Meurer L, de Souza IC, Torres IL, Caumo W. Melatonin treatment entrains the rest-activity circadian rhythm in rats with chronic inflammation. *Chronobiol Int.* 2013; 30(9): 1077-1088.
61. Laste G, Ripoll Rozisky J, Caumo W, Lucena da Silva Torres I. Short- but Not Long-Term Melatonin Administration Reduces Central Levels of Brain-Derived Neurotrophic Factor in Rats with Inflammatory Pain. *Neuroimmunomodulation.* 2015; Apr 11. [Epub ahead of print]

62. Laurido C, Pelissie T, Soto-Moyano R, Valladares L, Flores F, Hernández A. Effect of melatonin on rat spinal cord nociceptive transmission. *Neuroreport*. 2002; 21;13(1):89-91.
63. Liebetanz D, Klinker F, Hering D, Koch R, Nitsche MA, Pötschka H, Löscher W, Paulus W, Tergau F. Anticonvulsant effects of transcranial direct-current stimulation (tDCS) in the rat cortical ramp model of focal epilepsy. *Epilepsia*. 2006; 47(7):1216–1224.
64. Liebetanz D, Koch R, Mayenfels S, König F, Paulus W, Nitsche MA. Safety limits of cathodal transcranial direct current stimulation in rats. *Clin. Neurophysiol*. 2009; 120: 1161–1167.
65. Lima MC, Fregni F. Motor cortex stimulation for chronic pain: systematic review and meta-analysis of the literature. *Neurology*. 2008; 70(24): 2329–2233.
66. Lu LX, Yon JH, Carter LB, Jevtovic-Todorovic V. General anesthesia activates BDNF-dependent neuroapoptosis in the developing rat brain. *Apoptosis*. 2006; 11(9): 1603-1605.
67. Lutsch EF, Morris RW. Light reversal of morphine-induced analgesia susceptibility rhythm in mice. *Experientia*. 1971; 27: 420-421.
68. Macchi MM, Bruce JN. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Front Neuroendocrinol*. 2004; 25(3-4): 177-195.
69. Macdonald AD, Woolfe G. Analgesic action of pethidine derivatives and related compounds. *Br J Pharmacol Chemother*. 1946; 1: 4-14.
70. Maleki N, Garjani A, Nazemiyeh H, Nilfouroushan N, Eftekhari Sadat AT, Allameh Z, Hasannia N. Potent anti-inflammatory activities of hydroalcoholic extract from aerial parts of *Stachys inflata* on rats. *Ethnopharmacol*. 2001; 75: 213–218.



71. Melo GM. Terapia farmacológica em disfunções temporomandibulares: uma breve revisão. *Revista Dentística online*. 2011; 21: 35-40.
72. Merskey H; Bogduk N. Descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. *Classification of chronic pain*. 2nd ed. Seattle: IASP Press, 1994:74.
73. Merighi A, Salio C, Ghirri A, Lossi L, Ferrini F, Betelli C, Bardoni R: BDNF as a painmodulator. *ProgNeurobiol* 2008; 85: 297–317.
74. Miles TS, Nauntofte B and Svensson P (eds.) *Clinical Oral Physiology*, Copenhagen: Quintessence, 2004.
75. Nascimento GC, Leite-Panissi CR. Time-dependent analysis of nociception and anxiety-like behavior in rats submitted to persistent inflammation of the temporomandibular joint. *Physiol Behav*. 2014; 10(125):1-7.
76. Nitsche MA, Paulus W. Excitability changes induced in the human motor cortex by weak transcranial direct current stimulation. *J Physiol*. 2000; 527 (3): 633-639.
77. Nitsche MA, Paulus W. Sustained excitability elevations induced by transcranial DC motor cortex stimulation in humans. *Neurology*. 2001; 57(10):1899-1901.
78. Nitsche MA, Cohen LG, Wassermann EM, Priori A, Lang N, Antal A, Paulus W, Hummel F, Boggio PS, Fregni F, Pascual-Leone A. Transcranial direct current stimulation: State of the art 2008. *Brain Stimul*. 2008; 1(3): 206-223.
79. Okeson, JP. *Tratamento das desordens temporomandibulares e oclusão*. 4. ed. São Paulo: Artes Médicas, 2000. 500p.
80. Okeson JP. *Bell's orofacial pain*. 5th edition. Chicago: Quintessence; 2005.

81. Ouyang W, Rutz S, Crellin NK, Valdez PA, Hymowitz SG. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annu Rev Immunol* 2011; 29: 71-109.
82. Peimani A, Sardary F. Effect of Low Level Laser on Healing of Temporomandibular Joint Osteoarthritis in Rats. 2014; 11(3): 319-327.
83. Pezet S, Onténiente B, Grannec G, Calvino B. Chronic pain is associated with increased TrkA immunoreactivity in spinoreticular neurons. *J Neurosci*. 1999;19(13): 5482-5492.
84. Purves D et al. *Neuroscience*. Third edition. Sinauer Associate, Inc. Sunderland, Massachusetts, USA. 2004.
85. Quevedo AS, Coghill RC. An illusion of proximal radiation of pain due to distally directed inhibition. *J Pain*. 2007; 8(3): 280–286.
86. Qin L, Wu X, et al. "Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration." *Glia*. 2007; 55(5): 453-462.
87. Raivio N, Tiraboschi E, Saarikoski ST, Castrén E, Kiiänmaa K. Brain-derived neurotrophic factor expression after acute administration of ethanol. *Eur J Pharmacol*. 2012. 687(1-3): 9-13.
88. Randic M, Jiang MC, Cerne R. Long-term potentiation and long-term depression of primary afferent neurotransmission in the rat spinal cord. *J Neurosci*. 1993; 13: 5228-5241.
89. Ren K, Dubner R. Pain facilitation and activity-dependent plasticity in pain modulatory circuitry: role of BDNF-TrkB signaling and NMDA receptors. *Mol Neurobiol*. 2007; 35(3): 224-235.
90. Riedel W, Neeck G. Nociception, pain, and antinociception: current concepts. *Rheumatol*. 2001; 60(6): 404-415.

91. Rosen AC, Ramkumar M, Nguyen T, Hoeft F. Noninvasive transcranial brain stimulation and pain. *Curr. Pain Headache Rep.* 2009; 13(1): 12–17.
92. Roveroni RC, Parada CA, Cecília M, Veiga FA, Tambeli CH. Development of a behavioral model of TMJ pain in rats: the TMJ formalin test. *Pain.* 2001; 94(2): 185-191.
93. Sarchielli P, Alberti A, Floridi A, Gallai V. Levels of nerve growth factor in cerebrospinal fluid of chronic daily headache patients. *Neurology.* 2001; 57:132-134.
94. Schaible, H.G. Pathophysiology of pain. *Orthopade,* 2007; 36(1): 8-16.
95. Schunck RV, Torres IL, Laste G, de Souza A, Macedo IC, Valle MT, Salomón JL, Moreira S, Kuo J, Arbo MD, Dallegrave E, Leal MB. Protracted alcohol abstinence induces analgesia in rats: Possible relationships with BDNF and interleukin-10. *Pharmacol Biochem Behav.* 2015; 135: 64-69.
96. Sessle BJ. Orofacial Pain. In: *The Paths of Pain. 1975-2005*, edited by Merskey H, Loeser JD, and Dubner R. Seattle, IASP Press, p131-150, 2005.
97. Shimizu K, Guo W, Wang H, Zou S, LaGraize SC, Iwata K, Wei F, Dubner R, Ren K. Differential involvement of trigeminal transition zone and laminated subnucleus caudalis in orofacial deep and cutaneous hyperalgesia: the effects of interleukin-10 and glial inhibitors. *Mol Pain.* 2009; 21: 5-75.
98. Silvetti M, Alexander W, Verguts T, Brown JW. From conflict management to reward-based decision making: Actors and critics in primate medial frontal cortex. *Neurosci Biobehav e Ver.* 2014; 1:44–57.
99. Sobreira CR, Zampier MRR. Revisão de literatura terapia farmacológica nas desordens temporomandibulares. *Un. Alfenas, Alfenas.* 1999; 5: 239-245.

100. Song M, Kellum JA. Interleukin-6. *Crit. Care Med.* 2005; 33: S463–S46.
101. Spears R, Dees LA, Sapozhnikov M, Bellinger LL, Hutchins B. Temporal changes in inflammatory mediator concentrations in an adjuvant model of temporomandibular joint inflammation. *J Orofac Pain.* 2005; 19: 34–40.
102. Spezia Adachi LN, Caumo W, Laste G, Medeiros LF, Rozisky JR, Souza A, Fregni F, Torres ILS. Reversal of chronic stress-induced pain by transcranial direct current stimulation (tDCS) in an animal model. *Brain Research.* 2012; 1489: 17-26.
103. Spezia Adachi LN, Quevedo A, Souza A, Scarabelot VL, Rozisky JR, Oliveira C, Marques P, Medeiros LF, Fregni F, Caumo W, Torres ILS. Exogenously induced brain activation regulates neuronal activity by top-down modulation: conceptualized model for electrical brain stimulation. *Exp Brain Res* 2015; 233(5):1377-1389.
104. Srinivasan V, Zakaria R, Jeet Singh H, Acuna-Castroviejo D. Melatonin and its agonists in pain modulation and its clinical application. *Arch Ital Biol.* 2012; 150(4): 274-289.
105. Tabas I, Glass CK. Anti-inflammatory therapy in chronic disease: challenges and opportunities. *Science.* 2013; 339(6116): 166-172.
106. Tanaka E, Detamore MS, Mercuri LG. Degenerative disorders of the temporomandibular joint: etiology, diagnosis, and treatment. *J Dent Res.* 2008; 87: 296–307.
107. Tao W, Chen Q, Zhou W, Wang Y, Wang L, Zhang Z. Persistent inflammation-induced up-regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) promotes synaptic delivery of  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor GluA1 subunits in descending pain modulatory circuits. *J Biol Chem.* 2014; 289(32): 22196-22204.
108. Tominaga K, Alstergren P, Kurita H, Kopp S. Serotonin in an antigen-induced arthritis of the rabbit temporomandibular joint. *Arch Oral Biol.* 1999 Jul;44(7):595-601.

109. Vaillancourt C, Berger N, Boksa P. Effects of vaginal birth versus caesarean section birth with general anesthesia on blood gases and brain energy metabolism in neonatal rats. *Exp. Neurol.* 1999; 160(1): 142–150.
110. van den Top M, Buijs RM, Ruijter JM, Delagrangé P, Spanswick D, Hermes ML. Melatonin generates an outward potassium current in rat suprachiasmatic nucleus neurones in vitro independent of their circadian rhythm. *Neuroscience.* 2001;107(1):99- 108.
111. van Rijn CM, Krijnen H, Menting-Hermeling S, Coenen AM. Decapitation in rats: latency to unconsciousness and the 'wave of death'. *PLoS One.* 2011; 27 6(1): e16514.
112. Vanecek J. Cellular mechanisms of melatonin action. *Physiological Reviews.* 1998; 78(3): 687–721.
113. Vidor LP, Torres IL, Custódio de Souza IC, Fregni F, Caumo W. Analgesic and sedative effects of melatonin in temporomandibular disorders: a double-blind, randomized, parallel-group, placebo-controlled study. *J Pain Symptom Manage.* 2013; 46(3): 422-432.
114. Wang S, Zhang L, Lim G, Sung B, Tian Y, Chou CW, Hernstadt H, Rusanescu G, Ma Y, Mao. Combined Effect of Dextromethorphan and Melatonin on Neuropathic Pain Behavior in Rats. *Brain Research.* 2009; 1288: 42-49.
115. Wang XD, Kou XX, He DQ, Zeng MM, Meng Z, Bi RY, Liu Y, Zhang JN, Gan YH, Zhou YH. Progression of cartilage degradation, bone resorption and pain in rat temporomandibular joint osteoarthritis induced by injection of iodoacetate. *PLoS One.* 2012; 7(9): e45036.
116. Wang ZY, Miki T, Lee KY, Yokoyama T, Kusaka T, Sumitani K, Warita K, Matsumoto Y, Yakura T, Hosomi N, Ameno K, Bedi KS, Takeuchi Y. Short-term exposure to ethanol causes a differential response between nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor ligand/receptor systems in the mouse cerebellum. *Neuroscience.* 2010; 20;165(2):485-91.

117. Weaver DR, Rivkees SA, Reppert SM. Localization and characterization of melatonin receptors in rodent brain by in vitro autoradiography. *Journal of Neurosciences*. 1989. 9 (7): 2581–2590.
118. Williams LM, Hannah LT, Hastings MH, Maywood ES. Melatonin receptors in the rat brain and pituitary. *Journal of Pineal Research*. 1995; 19 (4): 173–177.
119. Wong H, Kang I, Dong XD, Christidis N, Ernberg M, Svensson P, Cairns BE. NGF-induced mechanical sensitization of the masseter muscle is mediated through peripheral NMDA receptors. *Neuroscience*. 2014; 269: 232-244.
120. Wilhelmsen M, Amirian I, Reiter RJ, Rosenberg J, Gögenur I. Analgesic effects of melatonin: a review of current evidence from experimental and clinical studies. *J Pineal Res*. 2011; 51(3): 270-277.
121. Wood AK, Klide AM, Pickup S, Kundel HL. Prolonged general anesthesia in MR studies of rats. *Acad. Radiol*. 2001; 8(11): 1136–1140.
122. Woolf, C.J. Recent advances in the pathophysiology of acute pain. *Br J Anaesth*. 1989; 63: 139-146.
123. Woolf CJ. Central sensitization: implications for the diagnosis and treatment of pain. *Pain*. 2011; 152(3): S2-15.
124. Yamasaki Y, Ren K, Shimada M, Iwata K. Modulation of paratrigeminal nociceptive neurons following temporomandibular joint inflammations in rats. *Exp Neurol*. 2008; 214(2): 209–218.
125. Yu CX, Zhu B, Xu SF, Cao XD, Wu GC. The analgesic effects of peripheral and central administration of melatonin in rats. *Eur J Pharmacol*. 2000; 403(1-2): 49-53.
126. Zaringhalam J, Manaheji H, Mghsoodi N, Farokhi B, Mirzaiee V. Spinal mu-opioid receptor expression and hyperalgesia with dexamethasone in chronic adjuvant arthritis rats. *Clin Exp Pharmacol Psysio*. 2008; 35:1309–1315.

127. Zhang HN, Ko MC. Seizure activity involved in the up-regulation of BDNF mRNA expression by activation of central mu opioid receptors. *Neuroscience*. 2009; 161: 301–310.
128. Zhang Z, Wang X, Wang W, Lu YG, Pan ZZ. Brain-derived neurotrophic factor-mediated downregulation of brainstem K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporter and cell-type-specific GABA impairment for activation of descending pain facilitation. *Mol Pharmacol*. 2013; 84(4): 511-520.
129. Zhao J, Seereeram A, Nassar MA, Levato A, Pezet S, Hathaway G, Morenilla-Palao C, Stirling C, Fitzgerald M, McMahon SB, Rios M, Wood JN: Nociceptor-derived brain-derived neurotrophic factor regulates acute and inflammatory but not neuropathic pain. *Mol Cell Neurosci*. 2006; 31: 539–548.
130. Zaghi S, Heine N, Fregni F. Brain stimulation for the treatment of pain: A review of costs, clinical effects, and mechanisms of treatment for three different central neuromodulatory approaches. *J Pain Manag*. 2009; 2(3): 339-352.
131. Zhou QQ, Imbe H, Dubner R, Ren K. Persistent Fos protein expression after orofacial deep or cutaneous tissue inflammation in rats: implications for persistent orofacial pain. *J Comp Neurol*. 1999; 412:276-291.
132. Zhuo M. Plasticity of NMDA receptor NR2B subunit in memory and chronic pain. *Mol Brain*. 2009; 3: 2-4.

**ANEXOS**



## ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética



**HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE  
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

### **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

A Comissão Científica e a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/HCPA) analisaram o projeto:

**Projeto:** 120104

**Data da Versão do Projeto:** 19/04/2012

**Pesquisadores:**

IRACI LUCENA DA SILVA TORRES  
ANA MARIA OLIVEIRA BATTASTINI  
LICIANE FERNANDES MEDEIROS  
LAUREN NAOMI SPEZIA ADACHI  
CARLA DE OLIVEIRA  
VANESSA LEAL SCARABELOT  
WOLNEI CAUMO

**Título:** AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ELETROESTIMULAÇÃO TRANSCRANIANA POR CORRENTE DIRETA (tDCS) EM MODELO DE DOR CRÔNICA OROFACIAL

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08/10/2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais.

- Os membros da CEUA/HCPA não participaram do processo de avaliação de projetos onde constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEUA/HCPA.

Porto Alegre, 24 de abril de 2012.

**Dr. Alessandro Osvaldt**  
Coordenador CEUA/HCPA

**ANEXO B – Divulgações**

**SCARABELOT, V.L.;** MEDEIROS, LICIANE F.; OLIVEIRA, C.; CIOATO, S.G.; ADACHI, L.N.S.; SOUZA, A.; CAUMO, W.; FREGNI, F.; TORRES, I.L.S. Efeitos da tDCS sobre os Níveis de Neuroimunomoduladores (BDNF, NGF, IL- 10 e IL- 6) em Tronco Cerebral de Ratos Submetidos a um Modelo de Dor Crônica Orofacial. In: VII Simpósio Internacional em Neuromodulação, 2015, São Paulo - SP. Anais do VII Simpósio Internacional em Neuromodulação, 2015. v. 1. p. 1-42.

**SCARABELOT, V. L.;** OLIVEIRA, C.; MARQUES, P.; CIOATO, S.G.; ADACHI, L.N.S.; MEDEIROS, L.F.; SOUZA, A.; QUEVEDO, A. S.; CAUMO, W.; TORRES, I. L. S. Estimulação Transcraniana por Corrente Contínua (ETCC) Reverte Aumento nos Níveis de BDNF em Tronco Encefálico de Ratos Submetidos a um Modelo de Dor Crônica Orofacial. In: 34ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2014, Porto Alegre. Anais da 34ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2014. v. 34. p. 283-284.

MUCHALE, A. V.; **SCARABELOT, V. L.;** OLIVEIRA, C.; MEDEIROS, L. F.; Marques, P.; CIOATO, S. G.; ADACHI, L. N. S.; SOUZA, A.; CAUMO, W; Torres I.L.S. Efeito da Dose Aguda de Melatonina sobre a Alodinia Mecânica e Níveis Séricos de BDNF de Ratos Submetidos a um Modelo de Dor Crônica Orofacial. In: 34ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2014. Anais da 34ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2014. v. 34. p. 284-284.

**SCARABELOT, V.L.;** OLIVEIRA, C.; MARQUES, P.; CIOATO, S.G.; ADACHI, L.N.S.; MEDEIROS, L.F.; SOUZA, A.; QUEVEDO, A.S.; CAUMO, W.; TORRES, I.L.S. Transcranial Direct Current Stimulation (TDCS) Reverses the Increase in BDNF Levels in the Brainstem of Rats Submitted to a Model Of Orofacial Chronic Pain. In: 15th World Congress on Pain - IASP, 2014, Buenos Aires. 15<sup>th</sup> World Congress on Pain - IASP, 2014.

**SCARABELOT, V.L.;** OLIVEIRA, C.; MEDEIROS, L.F.; MARQUES, P.; CIOATO, S.G.; ADACHI, L.N.S.; SOUZA A.; QUEVEDO, A.; CAUMO, W.; TORRES I.L.S. Effect of Acute Melatonin Administration in a Model of Chronic Orofacial Pain. In: 46° Brazilian Congress on Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2014, Fortaleza/CE. Anais do 46° Brazilian Congress on Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2014. V. 46.

**SCARABELOT, V.L.;** OLIVEIRA, C.; MEDEIROS, L.F.; MARQUES, P.; CIOATO, S.G.; SOUZA, A.; NUNES, E.; TORRES, I.L.S. Eletroestimulação Transcraniana por Corrente Direta (TDCS) Reverte a Alodinia Mecânica de Ratos Submetidos a um Modelo de Dor Crônica Orofacial. In: XLVIII Congresso Anual da Sociedade Brasileira de Fisiologia, 2013, Ribeirão Preto - SP. Anais do XLVIII Congresso Anual da Sociedade Brasileira de Fisiologia, 2013. p. 245-246.

MEDEIROS, L.F.; **SCARABELOT, V.L.;** OLIVEIRA, C.; MARQUES, P.; CIOATO, S.G.; SOUZA, A.; TORRES, I.L.S. Administração Aguda de Melatonina Reverte Alodinia Mecânica em Ratos *Sprague-Dawley* Submetidos a um Modelo de Dor Crônica Orofacial. In: XLVIII Congresso Anual da Sociedade Brasileira de Fisiologia, 2013, Ribeirão Preto - SP. Anais do XLVIII Congresso Anual Da Sociedade Brasileira de Fisiologia, 2013. p. 247-248.

**SCARABELOT, V.L.;** OLIVEIRA, C.; CIOATO, S.G.; MARQUES, P.; ADACHI, L.N.S.; MEDEIROS, L.F.; SOUZA, A.; MACEDO, I.C.; CAUMO, W.; TORRES, I.L.S. Transcranial Direct Current Stimulation reverts mechanic alodinia in rats with chronic orofacial pain. In: V Simpósio Internacional em Neuromodulação, 2013, São Paulo. Anais do V Simpósio Internacional de Neuromodulação, 2013. v. 1. p. 31-32.

OLIVEIRA, C.; **SCARABELOT, V.L.;** CIOATO, S.G.; MARQUES, P.; MEDEIROS, L.F.; SOUZA, A.; ADACHI, L.N.S.; CAUMO, W.; TORRES, I. L. S. Reversal of thermal Hyperalgesia by Transcranial Direct Current Stimulation (tDCS) in Rats Subjected to Orofacial Chronic Pain Model. In: V Simpósio Internacional em Neuromodulação, 2013, São Paulo - SP. Anais do V Simpósio Internacional em Neuromodulação, 2013. v. 1. p. 9-10.

**ANEXO C - Artigos publicados no período do Doutorado**

**Scarabelot, V.L.**, Cavagni J., Medeiros L.F., Detânico, B., Rozisky, J.R., Souza, A., Daudt, L.D., Gaio, E.J., Ferreira, M.B.C., Rösing, C. K., Battastini, A.M.O., Torres, I.L.S. Periodontal disease and high doses of inhaled corticosteroids alter NTPDase activity in the blood serum of rats. *Archives of Oral Biology*, v. 59, p. 841-847, 2014.

**Scarabelot, V.L.**, Munerato, M.C., Medeiros, L.F., Oliveira, M.G., Chaves, A.C.M., SOUZA, A., Vercelino, R., Caumo, W., Torres, I.L.S. Factors associated to salivary flow: alterations in dry mouth female patients. *Revista Dor*, v. 15, p. 245-249, 2014.

Spezia Adachi, L.N., Quevedo, A.S., Souza, A., **Scarabelot, V.L.**, Rozisky, J.R., Oliveira, C., Marques, P.R., Medeiros, L.F., Fregni, F., Caumo, W., Torres, I.L.S. Exogenously induced brain activation regulates neuronal activity by top-down modulation: conceptualized model for electrical brain stimulation. *Experimental Brain Research*, v. 233, p. 1377-1389, 2015.

Souza, A.C., Souza, A. Medeiros, L.F., Oliveira, C., **Scarabelot, V.L.**, Silva, R.S., Bogo, M.R., Capiotti, K.M., Kist, L.W., Bonan, C.D., Caumo, W., Torres, I.L.S. Maternal caffeine exposure alters neuromotor development and hippocampus acetylcholinesterase activity in rat offspring. *Brain Research*, v. 1595, p. 10-18, 2015.

Marques, P.R., Vercelino, R., Cioato, S.G., Medeiros, L.F., Oliveira, C., **Scarabelot, V.L.**, Souza, A., Rozisky, J.R., Quevedo, A., Adachi, L.N.S., Sanches, P.R., Fregni, F., Caumo, W., Torres, I.L.S. Transcranial direct current stimulation (tDCS) reverts behavioral alterations and brainstem

BDNF levels increase induced by neuropathic pain model: Long-lasting effect. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, v. 64, p. 44-51, 2015.

Adachi, L.N.S., Quevedo, A., Souza, A., **Scarabelot, V.L.**, Rozisky, J.R., Oliveira, C., Marques, P., Medeiros, L.F., Fregni, F., Caumo, W., Torres I.L.S. Exogenously induced brain activation regulates neuronal activity by top-down modulation: conceptualized model for electrical brain stimulation. *Experimental Brain Research*, v. 233, p. 1377-1389, 2015.

Souza, A., Dussan-Sarria, J.A, Medeiros, L.F., Souza, A.C., Oliveira, C., **Scarabelot, V.L.**, Adachi, L.N.S., Winkelmann-Duarte, E.C., Philippi-Martins, B.B., Netto, C.A., Caumo, W., Torres, I. L.S. Neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy reduces c-Fos activation in the rat hippocampus: evidence of a long-lasting effect. *International Journal of Developmental Neuroscience*, v. 38, p. 213-222, 2014.

Oliveira, C., **Scarabelot, V.L.**, Souza, A., Oliveira, C.M., Medeiros, L.F., Macedo, I.C., Marques, P., Cioato, S.G., Caumo, W., Torres, I.L.S. Obesity and chronic stress are able to desynchronize the temporal pattern of serum levels of leptin and triglycerides. *Peptides (New York, N.Y. 1980)*, v. 51, p. 46-53, 2013.

Medeiros, L.F., Souza, A.C.; Souza, A., Cioato, S.G., **Scarabelot, V.L.**, Caumo, W., Fernandes, L.C., Torres, I.L.S. Fentanyl administration in infant rats produces long-term behavioral responses. *International Journal of Developmental Neuroscience*, v. 30 (1), p. 25-30, 2012.

Macedo, I.C., Medeiros, L.F., Oliveira, C., Oliveira, C.M., Rozisky, J.R., **Scarabelot, V.L.**, SOUZA, A., Silva, F.R., Santos, V.S., Cioato, S.G., Caumo, W., Torres, I.L.S. Cafeteria diet-induced obesity plus chronic stress alter serum leptin levels. *Peptides* (New York, N.Y. 1980), v. 38, p. 189-196, 2012.

## ANEXO D – Artigo 1 submetido ao periódico Pain Medicine

Pain Medicine



### Transcranial Direct Current Stimulation (tDCS) Reverses Nociceptive Behavior in an Orofacial Pain Model

Journal:	<i>Pain Medicine</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Original
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	<p>Scarabelot, Vanessa; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Post-Graduate Program in Biological Sciences: Physiology. Health Basic Sciences Institute.</p> <p>Medeiros, Liciane; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Laboratory of Pain Pharmacology and Neuromodulation: Pre-clinical Research, Pharmacology Department, Health Basic Sciences Institute.</p> <p>Oliveira, Carla; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Laboratory of Pain Pharmacology and Neuromodulation: Pre-clinical Research, Pharmacology Department, Health Basic Sciences Institute.</p> <p>Cioato, Stefania; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Laboratory of Pain Pharmacology and Neuromodulation: Pre-clinical Research, Pharmacology Department, Health Basic Sciences Institute.</p> <p>Adachi, Lauren Naomi; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Laboratory of Pain Pharmacology and Neuromodulation: Pre-clinical Research, Pharmacology Department, Health Basic Sciences Institute.</p> <p>Souza, Andressa; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Laboratory of Pain Pharmacology and Neuromodulation: Pre-clinical Research, Pharmacology Department, Health Basic Sciences Institute.</p> <p>Paz, Ana Helena; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Morphological Sciences Department, Health Basic Sciences Institute.</p> <p>Caumo, Wolnei; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Department of Surgery in Medical School</p> <p>Fregni, Felipe; Harvard Medical School, Department of Physical Medicine and Rehabilitation</p> <p>Torres, Iraci Lucena; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Pharmacology Department, Health Basic Sciences Institute</p>
Keywords:	Neuromodulation, Hyperalgesia, Orofacial Pain, tDCS, Temporomandibular disorders

SCHOLARONE™  
Manuscripts

Official Journal of the American Academy of Pain Medicine



## **Transcranial Direct Current Stimulation (tDCS) Reverses Nociceptive Behavior in an Orofacial Pain Model**

Vanessa Leal Scarabelot<sup>1,2,3</sup>, Liciane Fernandes Medeiros<sup>2,3</sup>, Carla de Oliveira<sup>2,3</sup>, Stefania Giotti Cioato<sup>2,3</sup>, Lauren Naomi Spezia Adachi<sup>2,3</sup>, Andressa de Souza<sup>2</sup>, Ana Helena Paz<sup>5</sup>, Wolnei Caumo<sup>4</sup>, Felipe Fregni<sup>6</sup>, Iraci Lucena da Silva Torres<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Post-Graduate Program in Biological Sciences: Physiology. Health Basic Sciences Institute, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90050-170, Porto Alegre, Brazil.

<sup>2</sup>Laboratory of Pain Pharmacology and Neuromodulation: Pre-clinical Research, Pharmacology Department, Health Basic Sciences Institute, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

<sup>3</sup>Animal Experimentation Unit and Graduate Research Group, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS 90035-003, Brazil

<sup>4</sup>Department of Surgery in Medical School, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 90035-003, Brazil

<sup>5</sup>Morphological Sciences Department, Health Basic Sciences Institute, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 90050-170, Brazil.

<sup>6</sup>Harvard Medical School, Department of Physical Medicine and Rehabilitation Boston, Massachusetts, United States

**Running head:** *tDCS reverses nociceptive behavior in rats.*

**Conflict of Interest:** There was no financial interest between any of the authors or any commercial interest in the outcome of this study.

**\* Corresponding author:**

Iraci Lucena da Silva Torres

Departamento de Farmacologia - ICBS, UFRGS.

Rua Sarmiento Leite, 500 sala 202.

90050-170 - Porto Alegre, RS, Brazil.

Phone: 0055-51 3316 3183; FAX: 0055-51 3316 3121.

E-mail: [iracitorres@gmail.com](mailto:iracitorres@gmail.com)

## ABSTRACT

**Objectives:** tDCS is a non-invasive method of cerebral stimulation that has been suggested as a therapeutic tool for pain and related to reverse of maladaptive plasticity associated with chronic pain. This experimental study evaluated the effect of tDCS on temporomandibular disorder (TMD) model, a chronic orofacial pain condition, and its effect on neuroimmunomodulators (BDNF, NGF, IL-10 and IL-6) in brainstem and blood serum. **Methods:** Male Sprague-Dawley rats were subjected to TMD model (Freund's adjuvant-CFA, 50 $\mu$ L intra-articular). The tDCS treatment consisted of a direct constant current with 0.5mA intensity applied using ECG electrodes with conductive adhesive hydrogel on the scalp for 20min/day/8days, beginning seven days after model induction. Mechanical and thermal hyperalgesia (Von Frey and hot plate tests) were evaluated at baseline, 7 days after model induction, immediately, 24 hours and 7 days after the end of treatment. Neuroimmunomodulators levels were determined by ELISA. Statistical analyses were performed by generalized estimating equation (GEE)/Bonferroni for behavioral tests and three-way ANOVA/Bonferroni for biochemical tests. **Results:** tDCS was able to reduce mechanical and thermal hyperalgesia (Wald $\chi^2=586.51;20$ , Wald $\chi^2=175.24;20$ ,  $p<0.01$ , respectively). **Conclusion:** Our results demonstrated the efficacy of anodal tDCS to revert hyperalgesic responses, and this result persists for seven days after the end of treatment. Besides, a specific-tissue profile of neuroimmunomodulators linked to the pain condition and tDCS treatment was observed. These findings suggest that multiple physiologic mechanisms mediate the analgesic effects of tDCS, involving changes in the processing of pain.

**Keywords:** orofacial pain, temporomandibular disorder, tDCS, hyperalgesia, neuromodulation.

## 1 INTRODUCTION

Orofacial pain is a painful condition that is associated with head tissues and neck and oral structures [1]. Temporomandibular disorders (TMD) comprise an important type of orofacial pain and are often accompanied by inflammation [2]. The inflammation affects the synovium and/or capsule and is a source of temporomandibular joint (TMJ) pain [3]. Redness, swelling and allodynia are common in TMD due to the release of neurotransmitters that cause peripheral sensitization [4].

Models of TMD, such as a Freund's Adjuvant (CFA) model, produce long-term inflammation in rats [5] by inducing the release of inflammatory mediators that promote acute and persistent pain [1,6]. Previous studies with CFA and TMD demonstrated elevated levels of calcitonin gene-related peptide (CGRP), nerve growth factor (NGF), interleukin-1 $\beta$ , and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) until 6 weeks after the CFA injection in rats [1,7]. Inflammation in the TMJ region results in an increase of excitability in the trigeminal subnucleus caudalis (Vc) [8]. Anti-inflammatory non-steroidal drugs have been largely used in the treatment of TMJ pain because of the inflammatory process. These drugs reduce edema and other symptoms resulting from the prostaglandin cascade; however, the pain physiopathology is not altered [9].

The peripheral and central sensitizations in the TMD require different therapeutics methods, and the approach is similar to that used in neuropathic pain [4]. In this context, non-pharmacological therapies could be associated with traditional therapies to amplify the efficacy and reduce adverse effects.

Transcranial direct current stimulation (tDCS) is a method of noninvasive brain modulation that has shown significant results on different types of chronic pain in humans and animals [10-13]. A small electrical direct current is applied, polarizing the neural tissue and altering the membrane threshold, resulting in subsequent changes in synaptic plasticity [14]. A previous study

by our research group using a model of hyperalgesia induced by chronic inflammation demonstrated that tDCS induces a significant, long-lasting behavioral effect [13]. Furthermore, tDCS was able to reverse the hyperalgesia and allodynia induced by the chronic restraint stress rat model; this study highlighted the cumulative effects of repetitive tDCS treatment that remained until 24 h after the end of treatment [12].

Considering that TMD is a chronic painful condition that reduces the life quality of the patients and that pharmacological treatments could cause side effects, the aim of this study was to investigate a non-pharmacological therapy for orofacial pain. Therefore, we evaluated the tDCS effect on thermal and mechanical hyperalgesia induced by chronic orofacial pain at the short- and medium-term. We further measured the effect of tDCS on the levels of BDNF, NGF, IL-6, and IL-10 in brainstem and in the peripheral blood serum at 24 h and seven days after the end tDCS treatment.

## **2 MATERIAL AND METHODS**

### *2.1 Animals*

Male Sprague Dawley rats weighing 250–300 g were used in this study. The animals (n=144) were randomized by weight, and three animals per home were housed in cages made of polypropylene material (49 x 34 x 16 cm) with the floor covered with sawdust. All of the animals were maintained in a controlled environment ( $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ), under a standard light-dark cycle (lights-on at 07:00 h and lights-off at 19:00 h) with water and chow (Nuvital, Porto Alegre/ Brazil) provided ad libitum. All of the experiments and procedures were approved by the Institutional Committee for Animal Care and Use (GPPG-HCPA protocol No. 12-0104) and conformed to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals 8th ed. 2011. The maintenance of the animals followed law 11.794 (Brazil), which establishes procedures for the scientific use of animals. The

experimental protocol complied with the ethical and methodological standards of the ARRIVE guidelines [15]. The experiment used the number of animals necessary to produce reliable scientific data.

## *2.2 Experimental groups*

The animals were randomized into six groups: the total Control group (C), which did not receive any intervention; Saline-Sham tDCS group (SS), which received vehicle of CFA into the TMJ and were subjected to sham tDCS treatment; Saline-tDCS group (ST), which received vehicle of CFA into the TMJ and were subjected to tDCS treatment; Orofacial pain group (O), which received CFA into the TMJ and did not receive any treatment; Orofacial pain-Sham tDCS group (OS), which received CFA into the TMJ and were subjected to sham tDCS treatment; and Orofacial pain-tDCS group (OT), which received CFA into the TMJ and were subjected to tDCS treatment.

## *2.3 Orofacial pain model induced by complete Freund's adjuvant (CFA)*

Initially, the rats were anesthetized with isoflurane 5% for induction, 2.5% for maintenance. Chronic inflammation was induced by intra-articular administration into the left TMJ region of 25  $\mu$ L of complete Freund's adjuvant (CFA, Sigma St Louis) (Mycobacterium tuberculosis) suspended (oil/saline, 1:1) in a total volume of 50  $\mu$ L or 50  $\mu$ L of a 0.9% saline solution (SAL). This dose was based on previous reports. The TMJ region was identified by palpation, and the injection was delivered manually by advancing a 30-gauge needle through the skin immediately inferior to the posterior border of the zygomatic arch until the needle contacted the mandibular condyle. CFA is considered to be a reliable irritant that produces long-term inflammation at the injection site and promotes acute and persistent pain [6]. Previous studies have shown that this dose of CFA injected into the TMJ causes persistent behavioral hyperalgesia [16-17].

#### *2.4 Transcranial Direct Current Stimulation (tDCS)*

Seven days after CFA administration, anodal stimulation was applied using ECG electrodes (1.5 cm<sup>2</sup>) by a battery-driven constant current stimulator designed for the continuous application of low currents to small mammals. This treatment was applied for 20 min/day over 8 days, as described by Spezia Adachi et al., (2012) [12]. In the present study, the electrodes were placed against the skin; this placement resembled the technique used in human studies of tDCS for pain [18-20]. The cathodal electrode was placed at the midpoint of the lateral angle of the eyes (supraorbital area), and the anodal electrode was positioned on the head using landmarks of the neck and shoulder lines as a guide (the anterior and posterior regions in the midline between the two hemispheres of the parietal cortex, as described by Takano et al., (2011) [21].

The intensity of constant current was 0.5 mA for 20min, this intensity was not able to produce skin lesions as observed in our previous studies [12,13]. Earlier study using a constant current of 1 mA intensity produced skin lesions, as current density is comparatively much higher than the traditional 1 mA tDCS using large pads in humans [22].

The sham stimulation replicated the real stimulation; however, the stimulator was turned off after 30 s of stimulation so the animals could maintain continuity of the physical sensation of the actual tDCS conditions [12,23].

#### *2.5 Von Frey Test*

Mechanical sensitivity of the vibrissal whisker pad was verified using an automatic von Frey aesthesiometer (Insight, São Paulo, Brazil) at baseline, 7 days after pain induction and immediately, 24 hours and 7 days after the final session of treatment with tDCS. Rat TMJ nociception was evaluated by measuring the threshold of force intensity required to be applied to

the TMJ region until a reflex response occurs (e.g., head withdrawal). All of the tests were performed by the same trained investigator blinded to treatment group.

### *2.6 Hot Plate Test*

This test was performed at baseline, 7 days after pain induction, and immediately, 24 hours and seven days after the final session of treatment with tDCS. This test was used as an indicator of the supraspinal pain process [12,24]. The licking or jumping responses during this test are considered to be the result of supraspinal sensory integration [25,26]. Twenty-four hours prior to testing, the animals were habituated to the apparatus for 5 minutes to avoid analgesia induced by the novelty of apparatus [27]. The temperature of the plate was maintained at  $55^{\circ}\text{C} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ , and the cut-off time was 20 seconds to avoid tissue damage. All of the tests were performed by the same trained investigator blinded to treatment group. This test was performed one hour after the first test (Von Frey).

### *2.7 Blood sampling and tissue collection*

One group of animals were killed by decapitation 24 h and other, 7 days after the end of treatment. Trunk blood was drawn, and blood samples were centrifuged in plastic tubes for 5 min at 5000 rpm at room temperature. The brainstem, hippocampus, and cerebral cortex, were collected and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for later analysis.

### *2.8 Biochemical assays*

BDNF, NGF, IL-6, and IL-10 analyses were performed on the brainstem, hippocampus, cerebral cortex homogenates, and serum using a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit for rats (R&D Systems, Minneapolis, United States). The total



protein was measured by Bradford's method using bovine serum albumin as the standard. The values were expressed in pg/mg of protein. The brain structures were homogenized with a hand-held homogenizer in 1:10 Tris-buffered saline and centrifuged for 20 min at 1,000 g. The results were expressed as a percentage of the control.

### *2.9 Histology and Histological Scoring*

Fourteen days after the CFA injection, the TMJs were excised and fixed in 10% buffered formalin for 7 days. The TMJs were then decalcified with 10% nitric acid and fixed in 10% buffered formalin. The tissues were then embedded in paraffin and sectioned. Slides containing the mandibular condyle, disc and retrodiscal area, and fossa were prepared and stained with hematoxylin and eosin (HE). A qualitative assessment of the degree of inflammation in the retrodiscal area was made using light microscopy. Scoring was based on a system used by Laste et al., (2012) [13]; the percentage of infiltrating mononuclear cells was scored as follows: 0 = absent, 1 = mild (1–10%), 2 = moderate (11–50%), 3 = severe (51–100%).

### *2.10 Statistical analysis*

The data were expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean (S.E.M). A estimating equation (GEE) followed by Bonferroni was performed to analyze the results of nociception. A three-way analysis of variance (ANOVA) followed by Student-Newman-Keuls (SNK) was performed to compare the biochemical data of all of the groups. The histological analysis were performed by one examiner without knowledge of the group designation and using the specimens that were coded and measured. Analysis of variance was used for intergroup comparisons. The results are reported as the mean  $\pm$  standard error and considered significant at  $P \leq 0.05$ . SPSS 20.0 for Windows was used for the statistical analyses.

### 3 RESULTS

#### 3.1. *Nociceptive behavior*

##### 3.1.1 Mechanical hyperalgesia

We demonstrated that tDCS treatment enhances the mechanical pain threshold of animals exposed to an orofacial pain model compared with the orofacial pain no-tDCS groups (O and OS). The generalized estimation equation presented interaction time x treatment ( $\chi^2=586.51$ ; 20)  $P<0.001$ . The tDCS group showed a significant increase in the pain threshold at the evaluated time points (immediately, 24 h, and 7 days after end of treatment) compared with the orofacial pain no-tDCS groups, suggesting an anti-hyperalgesic effect (Fig. 1, Panel A).

##### 3.1.2 Thermal hyperalgesia

The response to thermal stimuli was modified by tDCS in animals subjected to the orofacial pain model. The generalized estimation equation showed interaction time x treatment (Wald  $\chi^2=175.24$ ; 20)  $P<0.001$ . The latency was significantly increased after the treatment compared with the orofacial pain no-tDCS groups (O and OS), suggesting an anti-hyperalgesic effect (Fig. 1, Panel B).

----- *Insert Figure 1* -----

#### 3.2. *Biochemical analysis*

##### 3.2.1 BDNF Levels

The BDNF levels were measured in the brainstem and serum. In the brainstem, we found interactions between the independent variables: orofacial pain, tDCS and timepoint (Three way ANOVA/SNK,  $F_{(1,64)}=7.86$ ,  $P<0.01$ ). We observed that the orofacial pain model (O and OS groups) presented increased levels of BDNF, which was reversed by active tDCS only at 24 h after the last

session of tDCS. In the serum levels, there was an interaction between orofacial pain x timepoint ( $F_{(2,74)}=3.10$ ,  $P<0.01$ ). It was possible to observe increased levels of BDNF seven days after the end of tDCS application (Fig. 2, Panel A,B).

----- *Insert Figure 2* -----

### 3.2.2 NGF Levels

The brainstem NGF levels analyses demonstrated interactions between the independent variables: orofacial pain x timepoint (three way ANOVA/SNK,  $F_{(2,53)}=4.17$ ,  $P<0.05$ ). Seven days after the end of tDCS, there was a significant decrease in NGF levels in the animals not exposed to orofacial pain (SS and ST). There were no observed significant effects of the independent variable in the serum NGF levels (Fig. 3, Panel A,B).

----- *Insert Figure 3* -----

### 3.2.3 IL-10 Levels

Three way ANOVA showed that there was an interaction between orofacial pain x timepoint in the brainstem IL-10 levels ( $F_{(2,66)}=10.72$ ,  $P<0.01$ ). There was an increase in the IL-10 levels seven days after the end of tDCS compared to the levels 24 h after end of tDCS treatment. The timepoint showed reduced serum IL-10 levels ( $F_{(1,73)}=4.36$ ,  $P<0.05$ ), Fig. 4, panel A and B.

### 3.2.4 IL-6 Levels

There were interactions between the three independent variables in the brainstem IL-6 levels: orofacial pain, tDCS and timepoint (three-way ANOVA/SNK,  $F_{(2,48)}=4.84$ ,  $P<0.05$ ). tDCS was able to reduce the increased level induced by orofacial pain. We observed an effect of sham tDCS on the group OS, although these effects did not persist seven days after the end of treatment. The

serum levels of IL-6 were not modified according to any independent variable (three-way ANOVA,  $P>0.05$ ) Fig. 4, panel C and D.

----- *Insert Figure 4* -----

### *3.3 Histological Scoring*

The histological findings for each group are shown in figure 5. The CFA injection provoked an inflammatory reaction with the presence of infiltrating mononuclear cells (macrophages, neutrophils and lymphocytes) in the retrodiscal area (under the synovial membrane). The groups receiving no CFA did not show signs of inflammation, whereas the other groups showed an inflammatory infiltrate (Table 1). In addition, fibrosis was present along with numerous droplet vacuoles, presumably lipids. The control groups (CT, SS and SE) presented normal tissue architecture of the TMJ (Fig.5 B, D and F), whereas the animals that received CFA presented highly abnormal histology of the TMJ, with pronounced inflammation in the retrodiscal area (Fig. 5 A, C and E). The inflammation scores were highest in the CFA treated groups (Table 1, Fig 5) compared with the control groups.

----- *Insert Figure 5 and table 1* -----

## **4 DISCUSSION**

This is an innovative study linking tDCS treatment and an orofacial pain model (TMD). We demonstrated that tDCS treatment reverses mechanical and thermal hyperalgesia induced by orofacial pain model. In addition, 7 days after the end of tDCS treatment was observed a cumulative analgesic effect. This last result goes beyond previous studies from our group that had already demonstrated the analgesic effect of tDCS until 24h after end of treatment [12,13]. We used CFA animal model to induce chronic orofacial pain (TMD), this condition persisted for 21 days after the

induction, and our histological analyses confirmed the presence of chronic inflammation. The mononuclear infiltrate and abundant lipid droplets are consistent with previous studies that used CFA-induced TMJ inflammation in the Sprague-Dawley rat model [28,29].

The behavioral test mechanisms used in this study involve different circuits at the spinal and supraspinal levels, we suggest that tDCS could activate the neural areas involved in pain processing, such as the thalamus and brainstem, activating descending inhibitory pathways, causing pain relief through a top-down modulation mechanism [30,31]. Additionally, we observed specific-tissue profiles of neuroimmunomodulators linked to pain conditions and tDCS treatment (BDNF, NGF, IL-6 and IL-10). Few studies in the literature assess the role of tDCS in the inflammatory process related to pathological conditions and to specific central nervous system structures.

The tDCS modulation on supraspinal circuits is not completely understood. The basic principle of tDCS consist in a weak electrical current is applied to the scalp surface between two electrodes (anode and cathode). The type of stimulation determines the effect of treatment; anodal stimulation typically increases the resting membrane potential [19]. tDCS is not a focal technique; therefore, it is difficult be spatially restricted to a selective brain region, particularly in small animals [31]. However, the cerebral cortex is a target of tDCS treatment because it is related to different activities, including detection, perception and modulation of pain information [32,33]. The top-down effect of tDCS involves projections to areas such as the periaqueductal gray area [30], thalamus, brainstem and spinal cord [31,34]. We investigated alterations in the BDNF levels in the brainstem and we observed a significant increase in the brainstem BDNF levels sixteen days after orofacial pain induction. The BDNF levels have been related to pain sensitivity [35], and it has an important pronociceptive role in inflammatory and neuropathic pain processes has been documented. A study by Guo et al. (2006) [36] suggested that the cascade of BDNF-TrkB receptors

in the rostral ventromedial medulla (RVM) circuitry is involved with the development of persistent pain after inflammation [37]. Furthermore, BDNF down regulates the  $K^+-Cl^-$  co-transporter ( $KCC_2$ ) that maintains the  $Cl^-$  gradient for inhibitory GABA synapses, resulting in a decrease of GABA inhibition with a consequent facilitation of pain [35]. Our results demonstrated a complete reversion of the increased BDNF levels in the brainstem by tDCS treatment, corroborating the results of a prior study from our group that showed a reduction in the BDNF levels in the spinal cord and brainstem of animals with hyperalgesia due to chronic stress [31]. We suggest that tDCS could modulate these neuroplastic events induced by chronic pain, decreasing the interaction BDNF-TrkB receptors. We also highlighted that anodal tDCS effects involve a cascade of events at the cellular and molecular levels associated with the modulation of the GABAergic system without discarding other systems, such as the glutamatergic, dopaminergic, serotonergic, and cholinergic systems [38].

Proceeding with the neuromodulatory processes, we evaluated the NGF levels at the brainstem. NGF is an important neurotrophin that might also play a role in chronic pain [39]. In our study, the orofacial pain model increased the brainstem NGF levels, which was not reversed by tDCS. The central NGF role in hyperalgesia is evident, earlier study showed increased NGF levels in the spinal fluid of patients with chronic headache [40]. In animal study, infusion of NGF intracerebroventricular induces pain like response in rats [41]. There are not pain studies that evaluated the effects of neuromodulatory techniques on neurotrophins such as BDNF or NGF. Furthermore, Brunoni et al., (2014) [42] observed no tDCS effects upon NGF plasma levels of patients in acute major depressive episode.

We evaluated the profile of neuroimmunomodulators associated with orofacial pain conditions and tDCS treatment. A decrease in IL-10 levels was observed in the brainstem. IL-10 is an anti-inflammatory cytokine released during the resolution phase of inflammation that prevents

tissue damage caused by infections and inflammation [43,44]. IL-10 acts on immune cells, suppressing the release of pro-inflammatory cytokines, such as IL-1 and TNF- $\alpha$  [45]. Our results at 24h after the end of treatment corroborates previous data that showed an imbalance between pro- and anti-inflammatory cytokines stimulates microglia to produce more pro-inflammatory mediators, which in turn might lead to neuroinflammation and consequent neurodegeneration [46]. Shimizu et al. (2009) [47], using a complete Freund's adjuvant induced inflammation model into masseter muscle, demonstrated that injection of IL-10 into the subnuclei caudalis of the trigeminal nucleus complex reduced hyperalgesia in the masseter region. Thus, we suggest that in the orofacial pain process, there is an imbalance in the inflammatory system triggered by decreased IL-10 levels.

In the analysis of the central IL-6 levels, we observed that the groups exposed to orofacial pain showed increased brainstem levels. This cytokine presents pro-inflammatory and regulatory effects in different sites, such as neural tissues, immune cells (T and B), macrophages, fibroblasts, microglia and astrocytes. IL-6 is rapidly induced during acute inflammation associated with injury, infection, and neuronal death [48,49]. The functions of this interleukin include the promotion of neuronal growth factor synthesis [49], interestingly, we found increased IL-6 and NGF levels in the brainstem. Moreover, tDCS decreased the IL-6 levels in the brainstem corroborating Brunoni et al. (2014) [42] that observed decreased serum IL-6 levels in depressive patients treated with tDCS.

Finally, we performed peripheral measures of BDNF, NGF, IL-10 and IL-6 in the blood serum. The main effect was the interaction timepoint x orofacial pain in the BDNF levels, demonstrating that these levels returned to baseline levels at seven days after the end of tDCS treatment. A study involving patients with central sensitivity syndrome showed increased BDNF serum levels compared with control subjects, suggesting this neuroplasticity mediator could be a screening tool for pain clinicians [50]. However, in our study the tDCS was not able to alter the

peripheral measures; but this result does not necessarily mean that tDCS does not induce neuroplastic or neuroimmune effects, but rather the peripheral blood levels that do not reflect those central effects in chronic orofacial pain.

There are limitations in our study, the sham group received active tDCS during 30 s trying to simulate that happens in researches involving tDCS and patients. However, this short application on the small area of rats head could modulate remote areas of neuroaxis as observed in brainstem NGF levels; seven days after end of treatment the sham group (OS) presents increased NGF levels compared to control group. Additionally, this alteration was state-dependent since in the no pain group this increase was not observed.

In summary, we demonstrated that anodal tDCS is effective for relieving short-, medium-, and long-term inflammatory pain. tDCS alters neuromodulatory mediators (BDNF, NGF and IL-6) levels in a rat orofacial pain model. These findings suggest that multiple physiologic mechanisms mediate the analgesic effects of tDCS involved in changes in pain processing. However, the mechanisms and the translation of this technique into clinical tools remain not fully understood. Furthermore, we observed an important role of the central immune system in the chronic inflammatory pain process, which could be involved with secondary hyperalgesia and neuroplastic changes. Considering all of these alterations, we suggest that tDCS could bring benefits to pain treatment as a non-pharmacological and non-invasive therapeutic option. The development of new studies to elucidate the full mechanisms of anodal tDCS is necessary to increase knowledge regarding the immediate and delayed effects of this technique.

### **Acknowledgements**

This study was supported by the following Brazilian funding agencies: the National Council for Scientific and Technological Development, CNPq (I.L.S. Torres, A. Scarabelot, Medeiros, L.F.);



the Committee for the Improvement of Higher Education Personnel, CAPES (P.R.M. Filho, C. de Oliveira, L.N.S Adachi); Graduate Research Group of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, GPPG (I.L.S. Torres, Grant 12-0104). DOCFIX FAPERGS/CAPES/09-2012 (A.S. Quevedo); (Dr. I.L.S. Torres). MCT/FINEP – COENG/2013.

**REFERENCES**

- [1] Nascimento GC, Leite-Panissi CRA. Time-dependent analysis of nociception and anxiety-like behavior in rats submitted to persistent inflammation of the temporomandibular joint. *Physiology & Behavior* 2014; 125:1–7.
- [2] Poveda-Roda R, Bagan JV, Diaz-Fernandez JM, Hernandez-Bazan S, Jimenez-Soriano Y. Review of temporomandibular joint pathology. Part I: classification, epidemiology and risk factors. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2007;12(4):E292–298.
- [3] Tanaka E, Detamore MS, Mercuri LG. Degenerative disorders of the temporomandibular joint: etiology, diagnosis, and treatment. *J Dent Res* 2008; 87:296–307.
- [4] Merrill RL. Central Mechanisms of Orofacial Pain. *Dent Clin N Am* 2007; 51:5–59.
- [5] Oliveira MC, Parada CA, Veiga MC, Podrigues LR, Barros SP, Tambeli CH. Evidence for the involvement of endogenous ATP and P2X receptors in TMJ pain. *Eur J Pain* 2005; 9:87–93.
- [6] Yamasaki Y, Ren K, Shimada M, Iwata K. Modulation of paratrigeminal nociceptive neurons following temporomandibular joint inflammations in rats. *Exp Neurol* 2008; 214(2):209-218.
- [7] Spears R, Dees LA, Sapozhnikov M, Bellinger LL, Hutchins B. Temporal changes in inflammatory mediator concentrations in an adjuvant model of temporomandibular joint inflammation. *J Orofac Pain* 2005;19:34–40.
- [8] Iwata K, Tashiro A, Tsuboi Y, Imai T, Sumino R, Morimoto T, Dubner R, Ren K. Medullary dorsal horn neuronal activity in rats with persistent temporomandibular joint and perioral inflammation. *J Neurophysiol* 1999; 82:1244–53.
- [9] Schütz TCB, Andersen ML, Tufik S. Sleep alterations in an experimental orofacial pain model in rats. *Brain Research* 2003;993:164–171.

- [10] Fregni F, Boggio PS, Lima MC et al. A sham-controlled, phase II trial of transcranial direct current stimulation for the treatment of central pain in traumatically spinal cord injury. *Pain* 2006; 122:197–209.
- [11] Fregni F, Feedman S, Pascual-Leone. Recent advances in the treatment of chronic pain with non-invasive brain stimulation techniques. *Lancet Neurol* 2007; 6(2): 6188:6191.
- [12] Spezia Adachi LNS, Caumo W, Laste G, Medeiros LF, Rozisky JR, Souza A, Fregni F, Torres ILS. Reversal of chronic stress-induced pain by transcranial direct current stimulation (tDCS) in an animal model. *Brain Research* 2012; 1489:17–26.
- [13] Laste G, Caumo W, Adachi LNS, Rozisky JR, Macedo IC, Filho PM, Partata WA, Fregni F, Torres ILS. Effect of transcranial direct current stimulation in hyperalgesia for chronic inflammation in rats. *Exp. Brain. Res* 2012; 221(1): 75–83.
- [14] Zaghi S, Acar M, Hultgren B, Boggio PS, Fregni F. Non invasive brain stimulation with low-intensity electrical currents: putative mechanisms of action for direct and alternating current stimulation. *Neuroscientist* 2010; 16(3): 285–307.
- [15] Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol* 2010; 8(6):1-6.
- [16] Bereiter DA, Okamoto K, Bereiter DF. Effect of persistent monoarthritis of the temporomandibular joint region on acute mustard oil-induced excitation of trigeminal subnucleuscaudalis neurons in male and female rats. *Pain* 2005;117:58–67.
- [17] Okamoto K, Tashiro A, Hirata H, Bereiter DA. Differential modulation of TMJ neurons in superficial laminae of trigeminal subnucleuscaudalis/upper cervical cord junction region of male and cycling female rats by morphine. *Pain* 2005; 114:203–211.

- [18] Nitsche MA, Cohen LG, Wassermann EM, Priori A, Lang N, Antal A, Paulus W, Hummel F, Boggio PS, Fregni F, Pascual-Leone A. Transcranial direct current stimulation: state of the art. *Brain Stimul* 2008;1:206–223.
- [19] Rosen AC, Ramkumar M, Nguyen T, Hoeft F. No invasive transcranial brain stimulation and pain. *Curr. Pain Headache Rep* 2009; 13(1): 12–17.
- [20] Antal P, Paulus W. A case of refractory orofacial pain treated by transcranial direct current stimulation applied over hand motor area in combination with NDA agonist drug intake. *Brain Stimul* 2011; 4:117–121.
- [21] Takano Y, Yokawac T, Masudac A, Niimic J, Tanakad S, Hironakaa N. A rat model for measuring the effectiveness of transcranial direct current stimulation using fMRI. *Neurosci. Lett* 2011; 491: 40–43.
- [22] Liebetanz D, Koch R, Mayenfels S, König F, Paulus W, Nitsche MA. Safety limits of cathodal transcranial direct current stimulation in rats. *Clin. Neurophysiol* 2009; 120:1161–1167.
- [23] Gandiga PC, Hummel FC, Cohen LG. Transcranial DC stimulation (tDCS): a tool for the double-blind sham-controlled clinical studies in brain stimulation. *Neurophysiol* 2006; 117: 845–850.
- [24] Ossipov MH, Kovelowski CJ, Nichols ML, Hruby VJ, Porreca F. Characterization of supraspinal antinociceptive actions of opioid delta agonists in the rat. *Pain* 1995; 62(3):287–93.
- [25] Caggiula R, Epstein LH, Perkins KA, Saylor S. Different methods of assessing nicotine-induced antinociception may engage different neural mechanisms. *Psychopharmacology* 1995;122(3):301–6.
- [26] Rubinstein M, Mogil JS, Japón M, Chan EC, Allen RG, Low MJ. Absence of opioid stress-induced analgesia in mice lacking beta-endorphin by site-directed mutagenesis. *Proc Natl AcadSci U S A* 1996; 93(9):3995–400.

- [27] Netto C A, Siegfried B, Izquierdo I. Analgesia induced by exposure to a novel environment in rats: effect of concurrent and post-training stressful stimulation. *Behav Neural Biol* 1987; 48(2):304–309.
- [28] Wang XD, Kou XX, Mao JJ, et al. Sustained inflammation induces degeneration of the temporomandibular joint. *J Dent Res* 2012; 91:499.
- [29] George MD, Owen CM, Reinhardt AL, Giannini PJ, Marx DB, Reinhardt RA. Effect of simvastatin injections on temporomandibular joint inflammation in growing rats. *J Oral Maxillofac Surg* 2013;71(5):846-53.
- [30] Lima MC, Fregni F. Motor cortex stimulation for chronic pain: systematic review and meta-analysis of the literature. *Neurology* 2008; 70(24): 2329- 37.
- [31] Spezia Adachi LNS, Quevedo A, Souza A, Scarabelot VL, Rozisky JR, Oliveira C, Marques P, Medeiros LF, Fregni F, Caumo W, Torres ILS. Exogenously induced brain activation regulates neuronal activity by top-down modulation: conceptualized model for electrical brain stimulation. *Exp Brain Res* 2015; 233(5):1377-89.
- [32] Quevedo AS, Coghill RC. An illusion of proximal radiation of pain due to distally directed inhibition. *J Pain* 2007; 8(3):280–286.
- [33] Silvetti M, Alexander W, Verguts T, Brown JW. From conflict management to reward-based decision making: Actors and critics in primate medial frontal cortex. *Neurosci Bio behave Rev* 2014;1:44–57.
- [34] Heinricher MM, Tavares I, Leith JL, Lumb BM. Descending control of nociception: specificity, recruitment and plasticity. *Brain Res Rev* 2009 60(1):214–225.
- [35] Zhang Z, Wang X, Wang W, Lu YG, Pan ZZ. Brain-derived neurotrophic factor-mediated downregulation of brainstem K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporter and cell-type-specific GABA impairment for activation of descending pain facilitation. *Mol Pharmacol* 2013; 84(4): 511-20.

- [36] Guo W, Robbins M T, Wei F, Zou S, Dubner R, Ren K. Supraspinal brain-derived neurotrophic factor signaling: a novel mechanism for descending pain facilitation. *J. Neurosci* 2006; 26:126–137.
- [37] Tao W, Chen Q, Zhou W, Wang Y, Wang L, Zhang Z. Persistent inflammation-induced up-regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) promotes synaptic delivery of  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor GluA1 subunits in descending pain modulatory circuits. *J Biol Chem* 2014; 289(32):22196-204.
- [38] Medeiros LF, de Souza IC, Vidor LP, de Souza A, Deitos A, Volz MS, Fregni F, Caumo W, Torres ILS. Neurobiological effects of transcranial direct current stimulation: a review. *Front Psychiatry* 2012; 3:110.
- [39] Wong H, Kang I, Dong XD, Christidis N, Ernberg M, Svensson P, Cairns BE. NGF-induced mechanical sensitization of the masseter muscle is mediated through peripheral NMDA receptors. *Neuroscience* 2014;269:232-44.
- [40] Sarchielli P, Alberti A, Floridi A, Gallai V. Levels of nerve growth factor in cerebrospinal fluid of chronic daily headache patients. *Neurology* 2001; 57:132-134.
- [41] Hao J, Ebendal T, Xu X, Wiesenfeld-Hallin Z, Eriksson Jonhagen M. Intra cerebro ventricular infusion of nerve growth factor induces pain-like response in rats. *Neurosci Lett* 2000; 286:208-212.
- [42] Brunoni AR, Machado-Vieira R, Zarate CA, Valiengo L, Vieira EL, Benseñor IM, Lotufo PA, Gattaz WF, Teixeira AL. Cytokines plasma levels during antidepressant treatment with sertraline and transcranial direct current stimulation (tDCS): results from a factorial, randomized, controlled trial. *Psychopharmacology (Berl)* 2014; 231(7):1315-23.
- [43] Ouyang W, Rutz S, Crellin NK, Valdez PA, Hymowitz SG. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annu Rev Immunol* 2011; 29:71-109.

- [44] Tabas I, Glass CK. Anti-inflammatory therapy in chronic disease: challenges and opportunities. *Science* 2013; 339(6116): 166-172.
- [45] Haddad JJ, Saade NE, Safieh-Garabedian B. Interleukin-10 and the regulation of mitogen-activated protein kinases: are these signalling modules targets for the anti-inflammatory action of this cytokine? *Cell Signal* 2003; 15(3):255-67.
- [46] Qin L, Wu X, et al. "Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration." *Glia* 2007; 55(5): 453-462.
- [47] Shimizu K, Guo W, Wang H, Zou S, La Graize SC, Iwata K, Wei F, Dubner R, Ren K. Differential involvement of trigeminal transition zone and laminated subnucleuscaudalis in orofacial deep and cutaneous hyperalgesia: the effects of interleukin-10 and glial inhibitors. *Mol Pain* 2009; 21:5-75.
- [48] Eliav E, Benoliel R, Herzberg U, Kalladka M, Tal M. The role of IL-6 and IL-1beta in painful perineural inflammatory neuritis. *Brain Behav Immun* 2009; 23(4):474-84.
- [49] Song M, Kellum JA. Interleukin-6. *Crit. Care Med* 2005; 33: S463–S46.
- [50] Deitos A, Dussán-Sarria JA, de Souza A, Medeiros L, Tarragô MD, Sehn F, Chassot M, Zanette S, Schwertner A, Fregni F, Torres IL, Caumo W. Clinical Value of Serum Neuroplasticity Mediators in Identifying the Central Sensitivity Syndrome in Patients with Chronic Pain with and Without Structural Pathology. *Clin J Pain* 2014; Dec 30. [Epub ahead of print].

## Legends

### Figure 1.

**Panel A.** Effect of tDCS on the mechanical allodynia response in an orofacial pain model at different timepoints measured by the Von Frey test. Data are presented as the mean±SEM, (N=52).

Total Control group (C); Saline-Sham tDCS group (SS); Saline-tDCS group (ST); Orofacial pain group (O); Orofacial pain-Sham tDCS group (OS); Orofacial pain-tDCS group (OT).

\* Different from all other groups (C, SS, ST, OS, and OT) seven days after CFA;

\*\* Different from the C, SS, ST, O groups seven days after CFA;

# Different from the SS, ST, O, and OS groups immediately after the last session of tDCS;

## Different from the C, SS, ST, and OT groups immediately after the last session of tDCS;

§ Different from all other groups (C, SS, ST, and OT) 24 h after the last session of tDCS;

+ Different from the C, O, OS groups seven days after the last session of tDCS;

++ Different from all other groups (C, SS, ST, and OT) seven days after the last session of tDCS;

GEE: ( $\chi^2=586.51$ ; 20)  $p<0.001$ .

**Panel B.** Effect of tDCS on thermal hyperalgesia response in an orofacial pain model at different timepoints measured by the Hot Plate test. Data are presented as the mean±SEM (N=52).

\* Different from all other groups (C, SS, and ST) seven days after CFA;

# Different from all other groups (C, SS, ST, and OT) immediately after the last session of tDCS;

§ Different from all other groups (C, SS, ST, and OT) 24 h after the last session of tDCS;

+ Different from the ST, O, OS, and OT groups seven days after the last session of tDCS;

++ Different from all other groups (C, SS, ST, and OT) seven days after the last session of tDCS;

GEE: ( $\chi^2=175.24$ ; 20)  $p<0.001$ .

### Figure 2.



**Panel A.** Brainstem BDNF levels. Data are presented as percentage of control (Mean $\pm$ SEM). Total Control group (C); Saline-Sham tDCS group (SS); Saline-tDCS group (ST); Orofacial pain group (O); Orofacial pain-Sham tDCS group (OS); Orofacial pain-tDCS group (OT). There is interaction between the independent variables: orofacial pain, tDCS and timepoint (three way ANOVA/SNK,  $F_{(1,64)}=7.86$ ,  $P<0.01$ ,  $N=76$ ).

**Panel B.** Serum BDNF levels. Data are presented as percentage of control (Mean $\pm$ SEM). There was an interaction between orofacial pain x timepoint (three-way ANOVA/SNK,  $F_{(2,74)}=3.10$ ,  $P<0.01$ ,  $N=86$ ).

### Figure 3

**Panel A.** Brainstem NGF levels. Data are presented as percentage of control (Mean $\pm$ SEM). Total Control group (C); Saline-Sham tDCS group (SS); Saline-tDCS group (ST); Orofacial pain group (O); Orofacial pain-Sham tDCS group (OS); Orofacial pain-tDCS group (OT). There was an interaction between the independent variables: orofacial pain and timepoint (three way ANOVA/SNK,  $F_{(2,53)}=4.17$ ,  $P<0.05$ ,  $N=65$ ).

**Panel B.** Serum NGF levels. Data are presented as percentage of control (Mean $\pm$ SEM). There were not significant effects of the independent variables on the serum NGF levels (three-way ANOVA,  $P>0.05$ ,  $N=75$ ).

### Figure 4

**Panel A.** Brainstem IL-10 levels. Data are presented as percentage of control (Mean $\pm$ SEM). Total Control group (C); Saline-Sham tDCS group (SS); Saline-tDCS group (ST); Orofacial pain group (O); Orofacial pain-Sham tDCS group (OS); Orofacial pain-tDCS group (OT).

There was an interaction between orofacial pain x timepoint (three-way ANOVA/SNK,  $P < 0.01$ ,  $N = 78$ ).

**Panel B.** Serum IL-10 levels. Data are presented as percentage of control (Mean $\pm$ SEM). There was an effect of timepoint in the serum levels (three-way ANOVA/SNK,  $P < 0.05$ ,  $N = 85$ ).

**Panel C.** Brainstem IL-6 levels. Data are presented as percentage of control (Mean $\pm$ SEM). There was interaction between orofacial pain, tDCS and timepoint, (three-way ANOVA/SNK,  $P < 0.01$ ,  $N = 60$ ).

**Panel D.** Serum IL-6 levels. Data are presented as percentage of control (Mean $\pm$ SEM). There was not effects upon serum levels (three-way ANOVA,  $P > 0.05$ ,  $N = 75$ ).

#### **Figure 5: Hematoxylin and eosin stained sections from TMJs.**

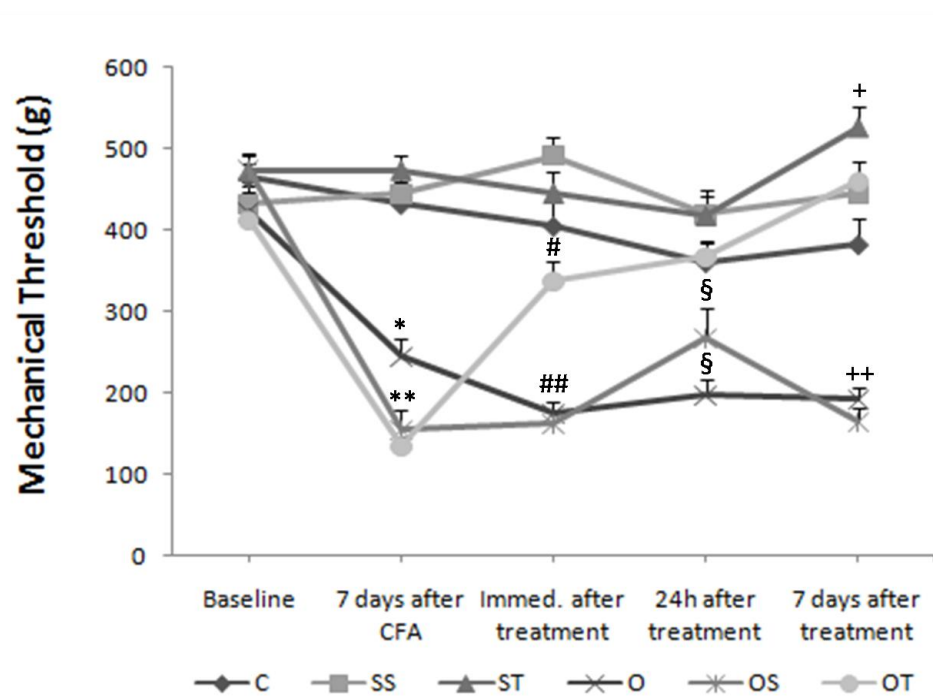
Hematoxylin and eosin stained sections from TMJs. The circles indicate infiltrating mononuclear cells (macrophages, neutrophils and lymphocytes). A, C, E: severe joint damage with increased inflammation in the retrodiscal area; B, D, F: normal TMJ architecture. X 40.

#### **Table 1: Histological Score**

The possible score ranged from 0 to 3. Significant differences are designed with the matching letters a,b,  $P \leq 0.001$ .

Figure 1

PANEL A



PANEL B

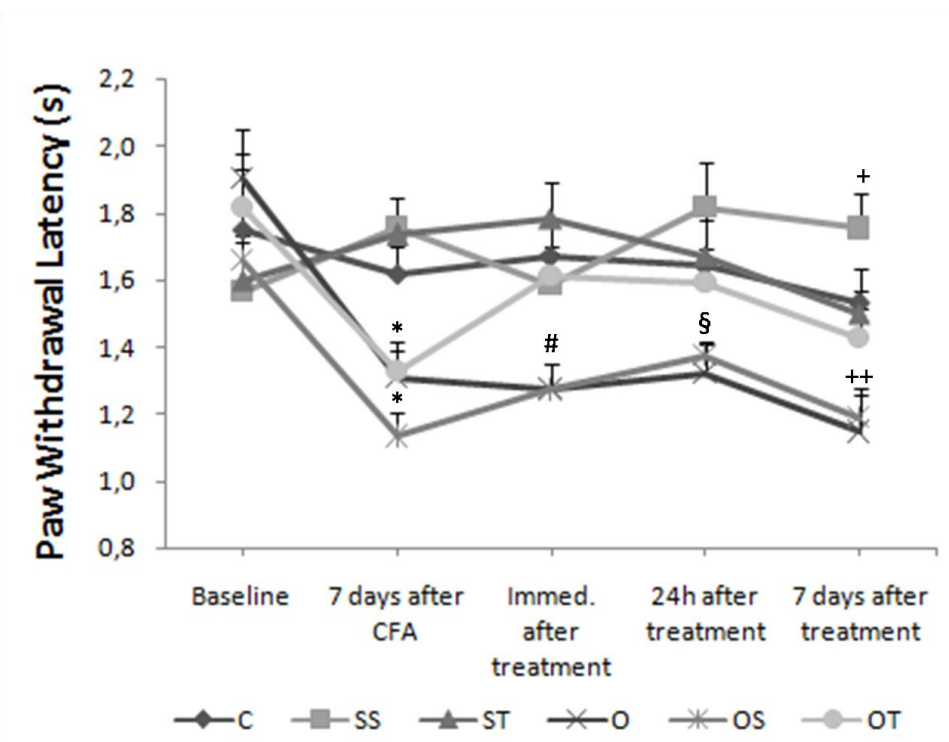
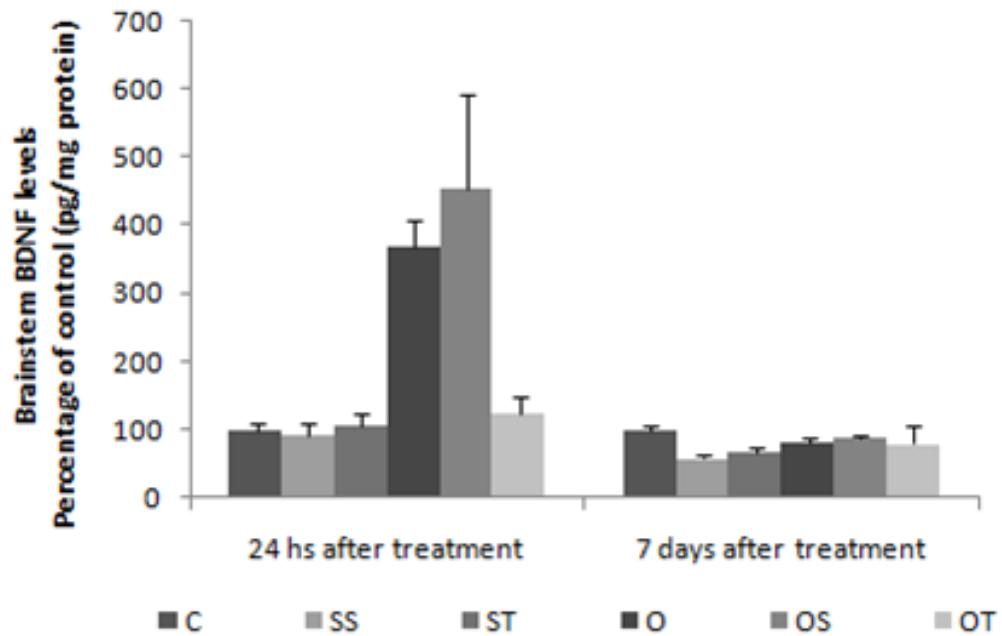


Figure 2

PANEL A



PANEL B

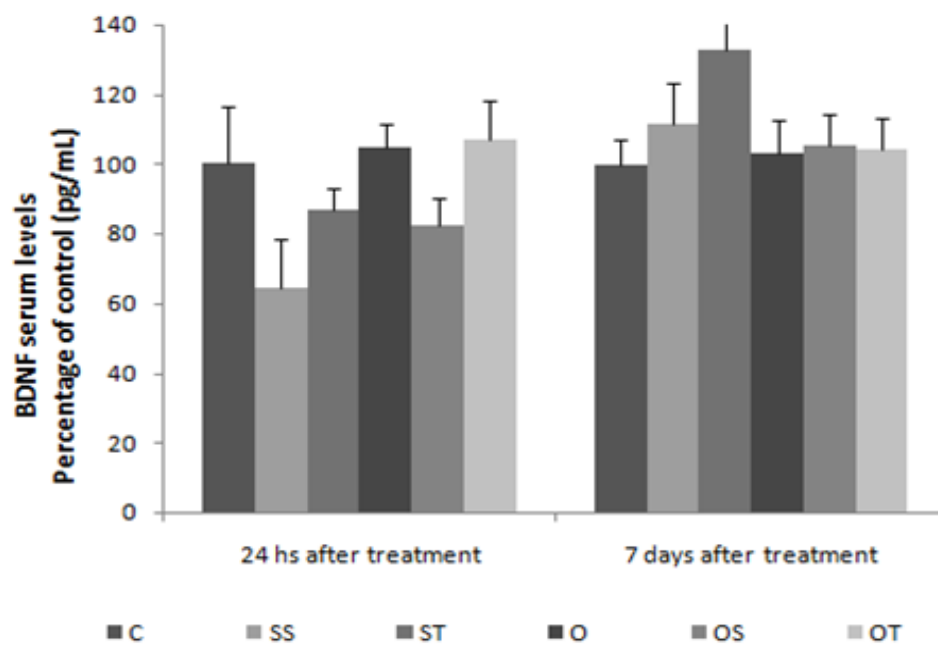
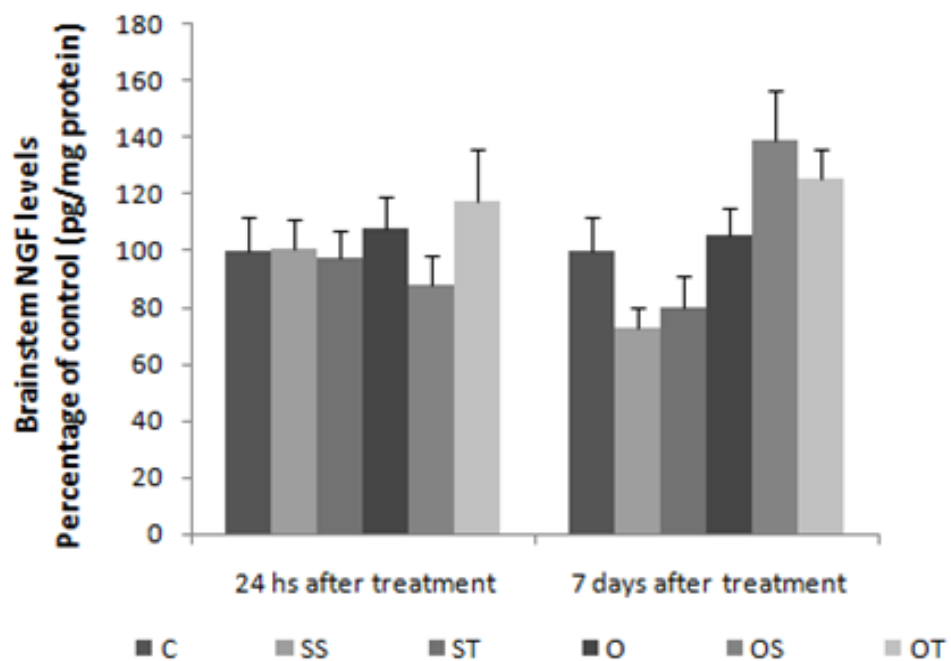


Figure 3

PANEL A



PANEL B

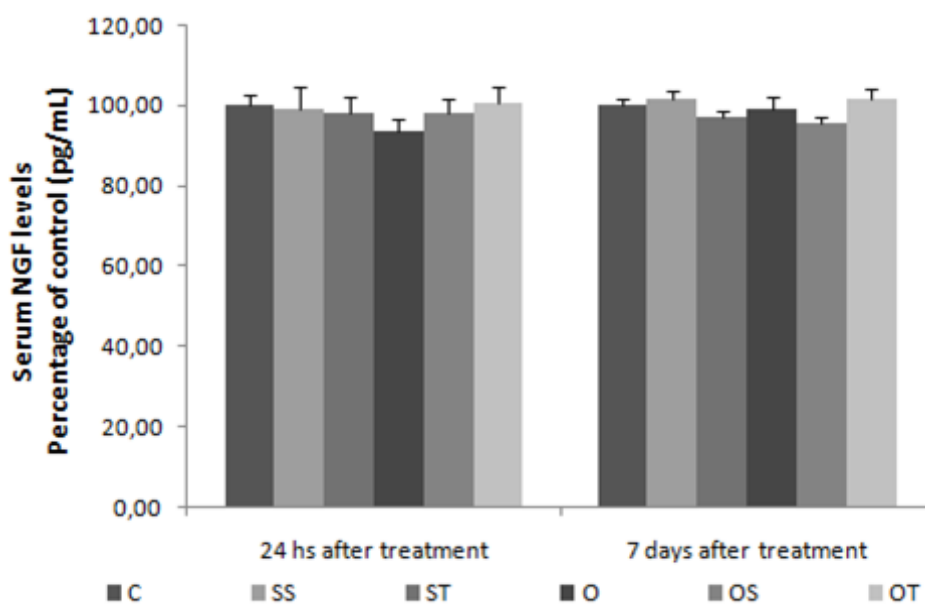
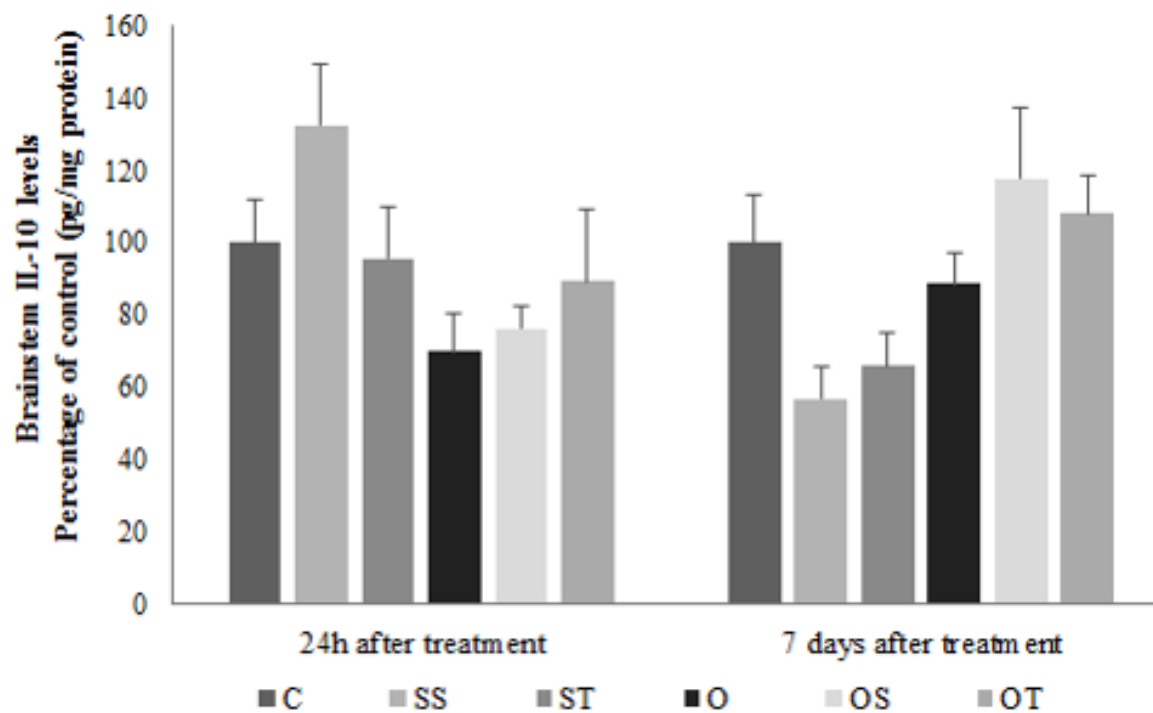
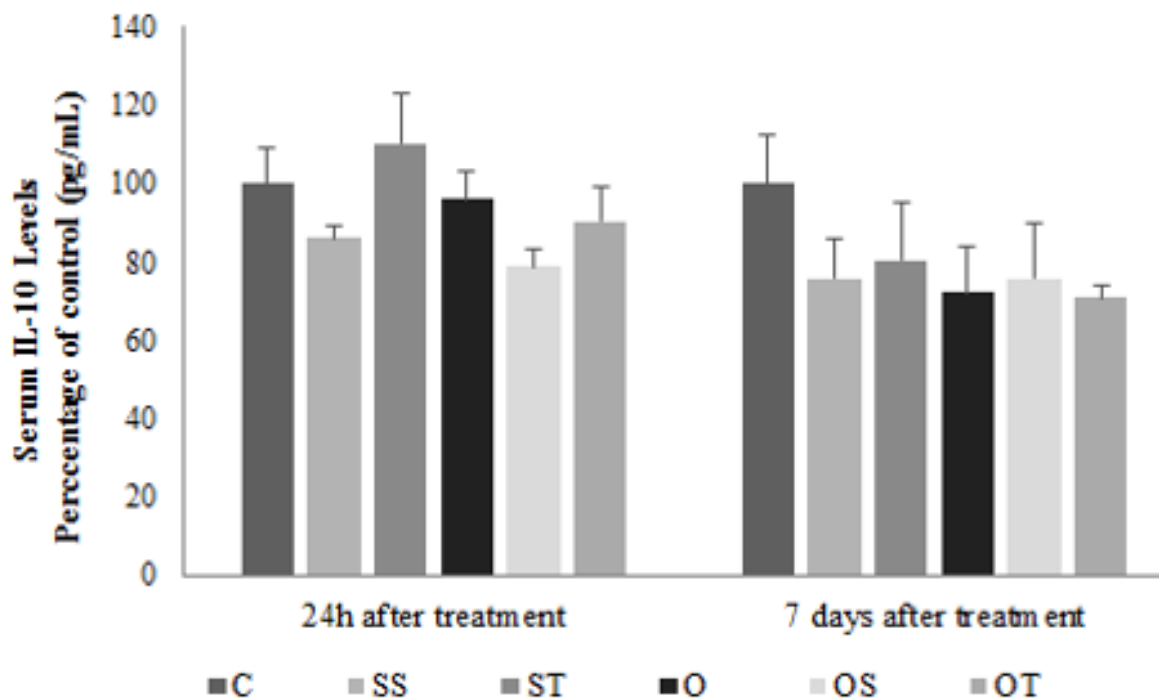


Figure 4

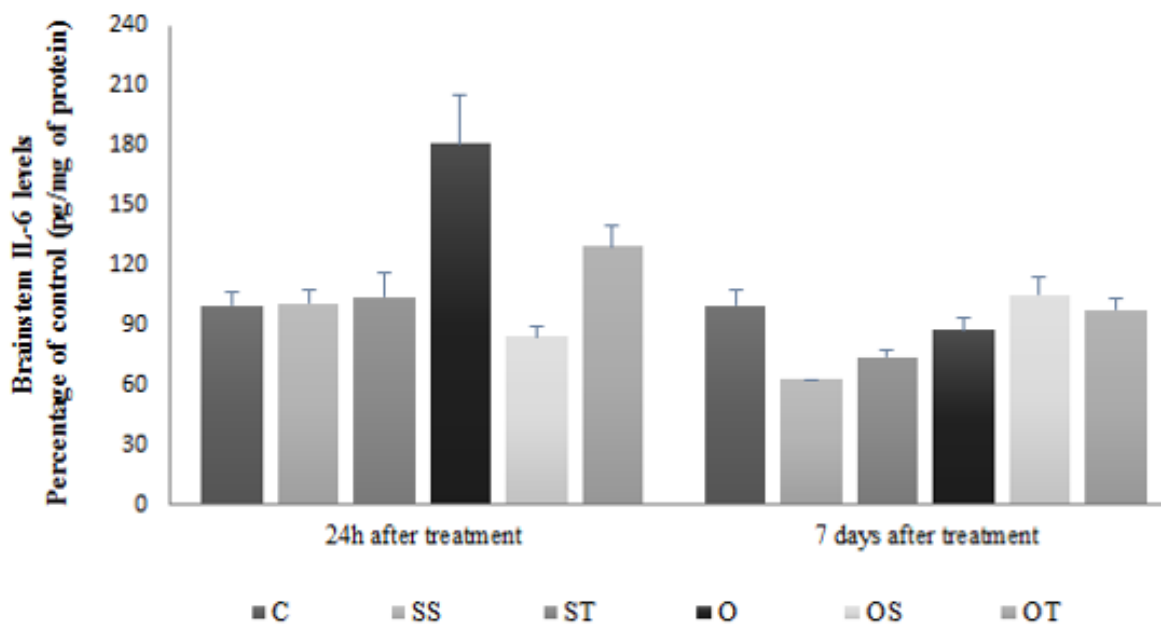
## PANEL A



## PANEL B



## PANEL C



## PANEL D

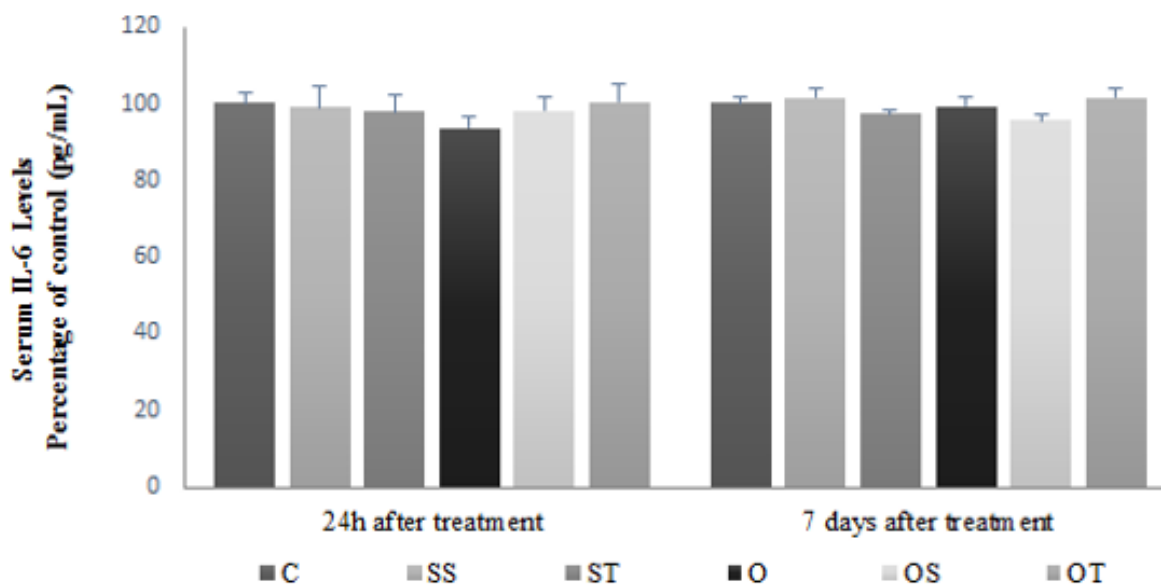
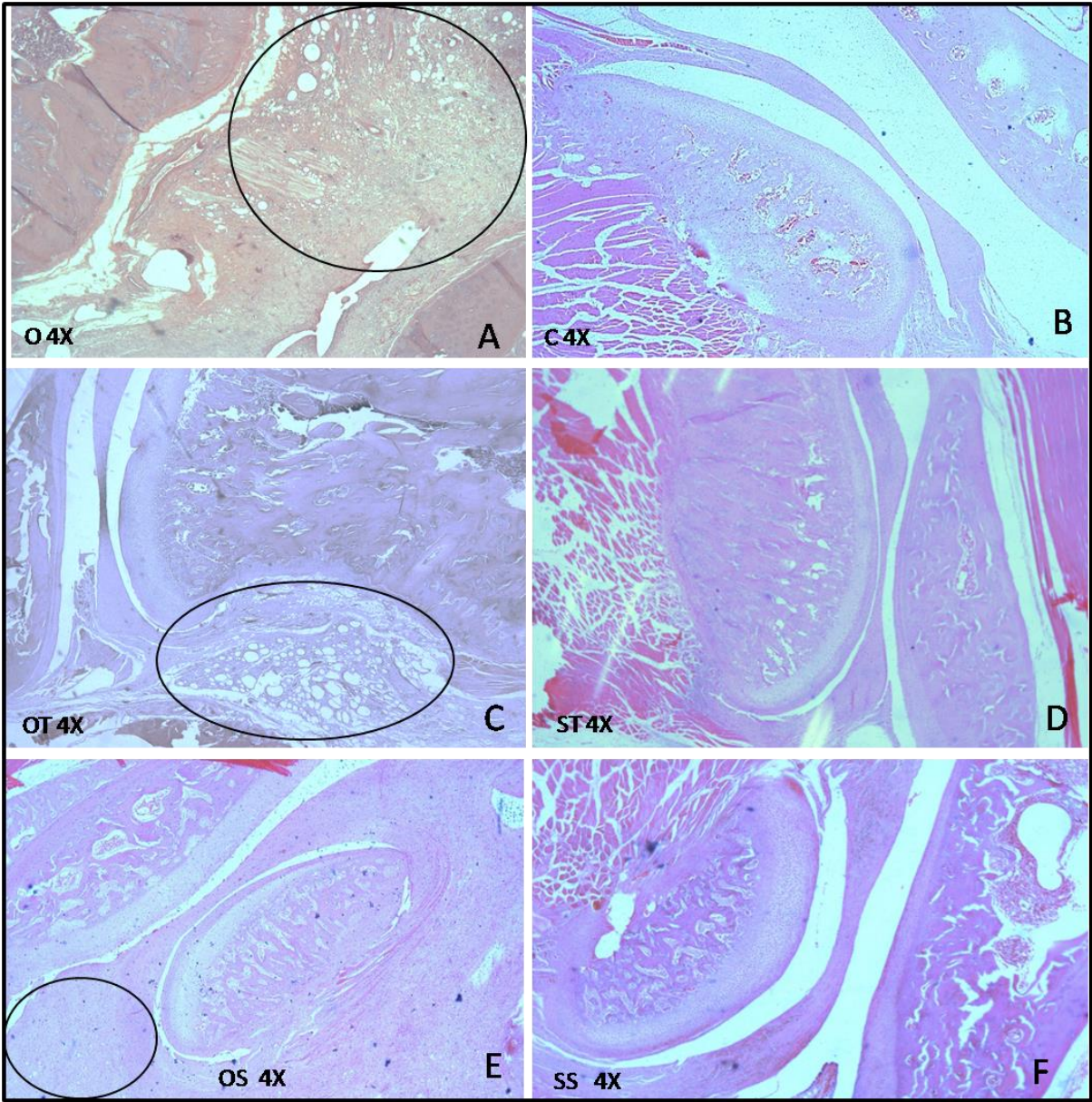


Figure 5





**Table 1**

<b>Group</b>	<b>Score (Mean <math>\pm</math> SE)</b>
C	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>
O	2.75 $\pm$ 0.25 <sup>b</sup>
OS	2.75 $\pm$ 0.25 <sup>b</sup>
OT	2.50 $\pm$ 0.28 <sup>b</sup>
SS	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>
ST	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>

**ANEXO E – Artigo 2 será submetido ao periódico European Journal of Pharmacology**

Melatonin alters the mechanical and thermal hyperalgesia induced by orofacial pain model in rats.

Vanessa Leal Scarabelot<sup>1,2,3</sup>, Liciane Fernandes Medeiros<sup>2,3</sup>, Carla de Oliveira<sup>2,3</sup>, Lauren Naomi Spezia Adachi<sup>2,3</sup>, Stefania Giotti Cioato<sup>2,3</sup>, Isabel Cristina de Macedo<sup>2,3</sup>, Joice S. de Freitas<sup>2,3</sup>, Andressa de Souza<sup>2</sup>, Alexandre Quevedo<sup>2</sup>, Wolnei Caumo<sup>4</sup>, Iraci Lucena da Silva Torres<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Post-Graduate Program in Biological Sciences: Physiology. Health Basic Sciences Institute, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 90050-170, Brazil.

<sup>2</sup>Laboratory of Pain Pharmacology and Neuromodulation: Preclinical Research, Pharmacology Department, Health Basic Sciences Institute, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 90050-170, Brazil.

<sup>3</sup>Animal Experimentation Unit and Graduate Research Group, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS 90035-003, Brazil

<sup>4</sup>Department of Surgery in Medical School, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 90035-003, Brazil

Conflict of Interest: There was no financial interest between any of the authors or any commercial interest in the outcome of this study.

\* Corresponding author:

Iraci Lucena da Silva Torres

Departamento de Farmacologia - ICBS, UFRGS.

Rua Sarmiento Leite, 500 sala 305.

90050-170 - Porto Alegre, RS, Brazil.

Phone: 0055-51 3316 3183; FAX: 0055-51 3316 3121.

E-mail: iracitorres@gmail.com

## ABSTRACT

The melatonin has received special attention in the pain treatment, since it is effective and presents few adverse effects. In this study, we evaluated the effect of acute dose of melatonin upon hyperalgesia induced by complete Freund's adjuvant (CFA) in a chronic orofacial pain model in *Sprague-Dawley* rats. The nociceptive behavior was assessed by facial von Frey and the hot-plate tests at baseline and thereafter 30, 60, and 120 min, 24h and seven days after melatonin treatment. We demonstrated that melatonin treatment alters the mechanical and thermal hyperalgesia induced by CFA. Besides, we observed that the altered levels of BDNF, NGF, IL-10 and IL-6 in the brainstem induced by melatonin or its vehicle were state-dependent of baseline of these animals.

**Keywords:** orofacial pain; temporomandibular disorder; melatonin; temporomandibular joint; chronic pain; neuroimmunomodulators.

## 1 INTRODUCTION

The Temporomandibular Joint (TMJ) is one of the most complex as well as most used joint in the human body (Ingawalé and Goswami, 2009). Temporomandibular disorders (TMD) is a generic term used for clinical conditions that involved TMJ. These conditions are characterized by pain in the TMJ and/or the masticatory muscles. Among the most common TMJ disorders are pain dysfunction syndrome, internal derangement, arthritis, and traumas (Detamore and Athanasiou, 2003; Ingawalé and Goswami, 2009). Other symptoms have been associated with TMD, including sleep disorders like insomnia and obstructive sleep apnea (Smith et al., 2009; Dubrovsky et al., 2014). One study reported a high prevalence of TMD in clinical patients with mild to moderate obstructive sleep apnea referred for a clinical dental evaluation, supporting the association between this conditions (Cunali et al., 2009).

A large amount of comorbidities and the chronic pain associated with TMD transform its treatment in a challenge for clinicians. Initially, the purpose of TMD treatment is to control the TMJ pain, recover the function of the masticatory system, re-educate the patient to minimize adverse loads that could perpetuate the problem. The pharmacological treatments for TMD include non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), and steroids immunosuppressants (Peimani and Sardary, 2014). The discovery of new drugs or non-pharmacological treatments, which are safer, seems necessary, due to lack of effectivity and side effects with use of standard therapies (Peimani and Sardary, 2014). In an attempt to minimize the pain and side effects, the melatonin appears as a new therapeutic option. It has been evaluated in experimental studies, reducing inflammatory pain (Laste et al., 2012; 2015) and improving a sleep quality (Zhang et al., 2013).

Melatonin is a neuroendocrine hormone, which is predominantly synthesized and secreted by the pineal gland, and it presents a wide range of physiological functions including regulating

circadian rhythms and sleep, enhancing immune function, sleep improvement, and anti-oxidant effects (Reiter et al., 2009; Laste, et al., 2012). Besides, many studies indicate that melatonin participates of pain transmission and sensitization (Laste et al., 2012; Huang, et al., 2013; Lopez-Canul et al., 2015), its effects are predominantly inhibitory on spinal nociception (Noseda et al. 2004). The analgesic properties of melatonin have been showed in previous studies from our group (Laste et al., 2012; 2015), in patients with TMD (Vidor et al., 2013), and rat model of pulpitis and arthritis (Li et al., 2015, Cardinali, 2004).

The membrane melatonin receptors (MT1 e MT2) have been identified in nervous system structures involved in nociceptive transmission (Ambriz-Tututi et al., 2009), such as thalamus, dorsal horn of the spinal cord, trigeminal tract, and trigeminal nucleus (Weaver et al., 1989; Williams et al., 1995). These receptors play a fundamental role in melatonin induced-antinociception upon nociceptive, neuropathic and inflammatory pain models (Ambriz-Tututi and Granados-Soto, 2007; 2009). There are studies that suggest that melatonin effect involve alterations in  $K^+$  and  $Ca^{2+}$  ion channel function similarly the opioid system (Vanecek, 1998; Arreola-Espino et al., 2007).

Considering the potential role of melatonin in antinociception and the lack of knowledge about melatonin as a potential analgesic in orofacial pain, the aim of this study was to evaluate the effect of acute melatonin administration in the nociceptive response and central biomarkers levels in an inflammatory orofacial pain model in rats.

## **2 MATERIAL AND METHODS**

## 2.1 Animals

Male Sprague-Dawley rats weighing 250–300 g were used in this study. The animals (N=36) were randomized by weight, and three animals per home were housed in cages made of polypropylene material (49 x 34 x 16 cm) with the floor covered with sawdust. All animals were maintained in a controlled environment ( $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ), under a standard light-dark cycle (lights-on at 07:00 h and lights-off at 19:00 h) with water and chow (Nuvital, Porto Alegre/Brazil) provided *ad libitum*. All experiments and procedures were approved by the Institutional Committee for Animal Care and Use (GPPG-HCPA protocol No. 12-0104), and conformed to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals 8th ed. 2011, and law 11.794 (Brazil), which establishes procedures for the scientific use of animals. The experimental protocol complied with the ethical and methodological standards of the ARRIVE guidelines (Kilkenny et al.,2010). The experiment used the number of animals necessary to produce reliable scientific data.

## 2.2 Experimental groups

The animals were randomized into six groups: the total Control group (C), which did not receive any intervention; Saline-Vehicle group (SV), which received CFA vehicle into the TMJ and it was injected with melatonin vehicle; Saline-melatonin group (SM), which received CFA vehicle into the TMJ and were subjected to melatonin treatment; Orofacial pain group (O), which received CFA into the TMJ and did not receive any treatment; Orofacial pain-vehicle (OV), which received CFA into the TMJ and were injected with vehicle of melatonin; and Orofacial pain-melatonin group (OM), which received CFA into the TMJ and were subjected to melatonin treatment.

## 2.3 Orofacial pain model induced by complete Freund's adjuvant (CFA)

Initially, the rats were anesthetized with isoflurane (5% for induction and 2.5% for maintenance). Chronic inflammation was induced by intra-articular administration into the left TMJ region of 25 $\mu$ L of complete Freund's adjuvant (CFA, Sigma St Louis) (*Mycobacterium tuberculosis*) suspended (oil/saline, 1:1) in a total volume of 50 $\mu$ L. Sham animals received 50 $\mu$ L of a 0.9% saline solution, these doses were based on previous report (Bereiter et al., 2005). The TMJ region was identified by palpation, and the injection was delivered manually by advancing a 30-gauge needle through the skin immediately inferior to the posterior border of the zygomatic arch until the needle contacted the mandibular condyle. Previous studies have shown that this dose of CFA injected into the TMJ causes persistent behavioral hyperalgesia (Bereiter et al., 2005; Okamoto et al., 2005).

#### *2.4 Melatonin treatment*

Rats in the melatonin group were treated with a single intraperitoneal injection of melatonin (50 mg/kg, final solution 50 mg/ml) (Laste et al., 2013; Wilhelmsen et al., 2011) purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo., USA), while those in the control group received vehicle (1% ethanol in saline). Treatment was administered seven days after CFA injection (Day 8 – Fig. 1).

----- *Insert Figure 1* -----

#### *2.5 Von Frey Test*

Mechanical sensitivity of the vibrissal whisker pad was verified using an automatic von Frey aesthesiometer (Insight, São Paulo, Brazil) at baseline, 30, 60, and 120 min, 24h and seven days after the treatment with melatonin. Rat TMJ nociception was evaluated by latency in grams of head withdrawal (force intensity). The same trained and blinded investigator to treatment group performed all tests.



## *2.6 Hot Plate Test*

This test was performed at baseline, seven days after CFA injection, 30, 60, and 120 min, 24h and seven days after the treatment with melatonin. This test was used as an indicator of the supraspinal pain process (Ossipov et al., 1995, Spezia Adachi et al., 2012). The licking or jumping responses during this test are considered the result of supraspinal sensory integration (Caggiula et al., 1995; Rubinstein et al., 1996). Twenty-four hours prior to testing, the animals were habituated to the apparatus for 5 minutes to avoid analgesia induced by the novelty of apparatus (Netto et al., 1987). The temperature of the plate was maintained at  $55^{\circ}\text{C} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ , and the cut-off time was 20 seconds to avoid tissue damage.

## *2.7 Blood sampling and tissue collection*

The animals were killed by decapitation 7 days after the end of treatment (Day 15 – Fig.1). Trunk blood was drawn, and blood samples were centrifuged in plastic tubes for 5 min at 5000 rpm at  $4^{\circ}\text{C}$  temperature. The brainstem was collected and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for later analysis.

## *2.8 Biochemical assays*

BDNF, NGF, IL-6, and IL-10 analyses were performed on the brainstem using a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit for rats (R&D Systems, Minneapolis, United States). The total protein was measured by Bradford's method (1976) using bovine serum albumin as the standard. The values were expressed in pg/mg of protein. The brainstem was homogenized with a hand-held homogenizer in with 1:10 Protease Inhibitor Cocktail (Sigma® #P8340) and centrifuged for 5 min at 10,000 rpm. The results were expressed as pg/mg of protein.

## 2.9 Statistical analysis

A Generalized Estimating Equation (GEE) followed by Bonferroni was performed to analyze the results of nociception. A one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Student-Newman-Keuls (SNK) was performed to compare the biochemical data between groups. The data were expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean (S.E.M) and considered significant at  $P \leq 0.05$ . SPSS 20.0 for Windows was used for the statistical analysis.

## 3 RESULTS

### 3.1 Nociceptive tests

In the test of mechanical allodynia by electronic Von Frey, it was observed interaction treatment X time (Wald  $\chi^2 = 2.03; 29$ ),  $P < 0.001$ . The orofacial pain model was able to induce hypersensitive response, the acute dose of melatonin reversed the nociceptive behavior and this effect remained for up to seven days after the treatment.

In the hot plate test, it was observed interaction treatment X time (Wald  $\chi^2 = 6.04; 27$ ),  $P < 0.001$ , the animals exposed to orofacial pain showed decreased latency withdrawal. The melatonin increased the latency withdrawal although this effect did not remain for as long as the von Frey test (Fig. 2, Panel A and B).

----- *Insert Figure 2* -----

### 3.2 Biomarkers levels

#### 3.2.1 BDNF levels

In the brainstem of animal exposed to orofacial pain model, it was observed an increase in the BDNF levels, which was reversed by melatonin at seven days after the administration of acute

dose, although this effect was also observed in the vehicle group (One-way ANOVA/SNK,  $F_{(5,30)}=27.35$ ,  $P<0.01$ ) (Fig. 3, Panel A). However, it is important to highlight that in the control groups (C, SV e SM) this effect it was not observed. Thus, the effects of melatonin and its vehicle in the BDNF brainstem levels were state-dependent, since the effects were different between SHAM and orofacial pain animals that received vehicle or melatonin treatment.

### 3.2.2 NGF Levels

In the brainstem, it was observed increased NGF levels in the animals exposed to orofacial pain, independently of received treatment (O, OV and OM groups), similar effect was observed in the Sham animals treated with melatonin or vehicle (SS and SM groups), suggesting vehicle effect (one-way ANOVA/SNK,  $F_{(5,26)}=18.01$ ,  $P<0.01$ ). (Fig.3, Panel B). A pronounced increase was observed in the SV and OM groups, since these groups were different from of SM, O and OV groups.

----- *Insert Figure 3* -----

### 3.2.3 IL-6 Levels

The IL-6 levels increased in the animals submitted to orofacial pain model and in the animals Sham treated with vehicle or melatonin (one-way ANOVA/SNK,  $F_{(5,26)}=6.39$ ,  $P<0.01$ ) (Fig.3 Panel C). Thus, for the IL-6 levels the effect of vehicle was state-dependent, since the treatments did not have effects in the orofacial pain animals (all groups orofacial pain are similar – O, OV e OM), but, there are effects in the Sham groups, SM group was different of control group and SV group was different from CT, SM, OV and OM.

### 3.2.4 IL-10 Levels

There was a significantly decrease in the brainstem IL-10 levels in the all groups submitted to orofacial pain model and in the Sham animals treated with melatonin or vehicle (one-way ANOVA/SNK,  $F_{(5,29)}=5.34$ ,  $P<0.01$ ) (Fig.3, Panel D). Similarly, to other biomarkers analyzed, the effects of vehicle upon the IL-10 levels were state-dependent, since there was not effects upon orofacial pain groups, but in the Sham groups, the vehicle increased the IL-10 levels.

#### **4 DISCUSSION**

The present study showed that acute melatonin administration alters mechanical and thermal hyperalgesia induced by orofacial pain model (TMD). Highlighting, that the melatonin effect upon mechanical hyperalgesia remained until seven days after its administration. In addition, we observed specific-tissue profiles of neuroimmunomodulators linked to pain conditions and/or melatonin effect (BDNF, NGF, IL-6 and IL-10) in the brainstem levels.

The inflammatory pain model induced by CFA has been widely used to test several analgesic drugs, including drugs with anti-inflammatory activity (Yamasaki et al., 2008; Kim et al., 2015; Laste et al., 2015). In our study, the TMD model was able to provoke nociceptive behavior until 15 days after pain induction. Tissue damage induced by CFA injection leads to the release of a range of inflammatory mediators (Maleki et al., 2001). Besides, CFA-induced inflammation has been shown to increase levels of cytokines and free radicals, this inflammatory “soup” sensitize nociceptive neurons, enhancing neuronal excitability and leads to secondary hyperalgesia (Zaringhalam et al., 2008).

The antinociceptive effect of melatonin observed in this study corroborates previous data from our group, that using chronic inflammatory model induced by CFA injected in the hind paw, showed reversion of the nociceptive response (Laste et al., 2012; 2015). This effect has a biological plausibility supported by pre-clinical evidence involving the activation of supraspinal sites

(Morgan et al., 1994). The melatonin receptors has been identified in the central nervous system structures involved in nociceptive process as thalamus, hypothalamus, dorsal horn of the spinal cord and trigeminal nucleus (Srinivasan et al., 2012). Experimental evidences suggest that the analgesic effects of melatonin are mediated by many systems, as opioid system, N-methyl-D-aspartate (NMDA), Nitric-oxide (NO) pathway, and others (for review see Ambriz-Tututi et al., 2009). The melatonin antinociceptive effect is blocked by mu ( $\mu$ ), NMDA, melatonergic and specific MT2 antagonist receptors. In addition, the peripheral nociceptive modulation presented by melatonin might be due to anti-inflammatory action through inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) and nitric oxide synthase (NOS) (Wang et al., 2009).

Furthermore, we showed that TMD model induces increase in the brainstem BDNF levels. BDNF plays an important role regulating inflammatory pain thresholds and secondary hyperalgesia (Zhao et al., 2006). It has been cited as a pain modulator, mainly, due to its capacity to modulate the of NMDA receptors (Merighi et al., 2008). Tao and colleagues (2014) showed the role of up-regulated BDNF gene in the distribution and enhancement of glutamatergic receptors in the brainstem after inflammation, through the BDNF/TrkB signaling. The increased expression of BDNF is involved also in the induction and maintenance phases of long-term potentiation (LTP) (Caldeira et al., 2007; Filho et al., 2015; Spezia Adachi et al., 2015). On the other hand, in our study, the melatonin vehicle reverses the elevated levels of BDNF induced by orofacial pain model. The vehicle or melatonin did not have effect in Sham groups, proposing that the effect of alcohol was state-dependent. Reduced BDNF-mRNA levels was observed in hippocampus, amygdala and frontal cortex after acute ethanol administration (Raivio et al., 2012). Considering that previous study showed relationship between BDNF and gabaergic system, we can suggested that the reduction in the BDNF levels exhibited in our findings could be linked to the increase in gabaergic transmission induced by alcohol administration (Kumar et al., 2009). However, we evaluated the

total structure (brainstem) without separate by subdivisions. Raivio et al. (2012) showed elevated BDNF levels into ventral tegmental area. Anyway, an important result of our study was the neuromodulatory ethanol effect had remained, at least seven days after its administration.

Proceeding with neuromodulators analysis, we observed an increase in NGF brainstem levels of the animals submitted to orofacial pain. This result is in agreement with Jing et al. (2009) that observed increased NGF levels in the red nucleus of animals submitted to neuropathic pain model. Another study showed an increased immunoreactivity NGF-TrkA receptor into spinal dorsal horn of rats submitted to adjuvant-induced arthritis (Pezet et al., 1999). It supports the hypothesis of NGF involvement in the neuronal plasticity linked to chronic pain (Pezet et al., 1999). It is important to note that this increase was also observed in the animals treated with melatonin or vehicle (SS, SM, and OM groups). The effects of melatonin and its vehicle in the NGF brainstem levels were state-dependent, since there was not difference between orofacial pain animals (O group) and vehicle orofacial pain animals (OV group). However, when these animal were treated with melatonin (OM group) the increase was significantly higher in relation other pain groups, similar to SV group. In the same way, the SHAM groups (SV and SM) presented an increased in relation to control group, suggesting an effect of alcohol 1% used as vehicle. Conversely, the melatonin administration was able to break the increase induced by vehicle (SM group), but not returning to the control level.

Our results point that a single ethanol administration can lead to neuromodulatory effects. In addition, Wang et al. (2010) showed alteration in the central NGF levels by the upregulated NGF/TrkA system into cerebellum of animals exposed to ethanol. According our results it is possible to affirm that chronic pain condition alters NGF levels; however, we suggest that NGF participates of plastic events that can be linked to a response of central nervous structures after ethanol damage. Melatonin was not able to reverse the increased NGF levels, nonetheless, a study

of Coiro and Vescovi (1998) demonstrated that physiological functions of melatonin were reduced in alcoholics.

Additionally, we observed an increase in the IL-6 brainstem levels of animals exposed to orofacial pain (O, OV and OM) and in the Sham melatonin or vehicle (SS and SM). In this case, we also can suggest that the effects of melatonin and its vehicle in the IL-6 brainstem levels were state-dependent, since the treatments did not have effects in the orofacial pain animals (all groups orofacial pain are similar – O, OV e OM), but, there are effects in the Sham. SM group was different of control group, and SV group was different from CT, SM, OV and OM, strongly suggesting an effect of alcohol 1% utilized as vehicle. Thus, an unique alcohol 1% administration in animal Sham was able of to modify central IL-6 levels seven days after its administration. The IL-6 is a pro-inflammatory cytokine present at elevated concentrations in the synovial fluid of temporomandibular joints (TMJs) in the some disorders, and in combination with others cytokines, promote degradation of cartilage and bone joint (Campos et al., 2006). Besides, IL-6 presents a central role in host defense and can be produced by many cell types, such as monocytes/macrophages, T cells, fibroblasts and endothelial cells. Our finding is the result of an analysis in a central structure; it corroborates studies that suggest that proinflammatory cytokines have different effects on the central nervous system as hyperalgesia avoidant behavior (Heffner et al., 2011).

Proceeding with cytokines analysis, we observed a decrease in the brainstem IL-10 levels in the animals submitted to orofacial pain model. It is important to note that this decrease also was observed in the animals treated with melatonin or vehicle (SS, SM, OV and OM groups). It suggest that the effects of alcohol 1% (vehicle) in the IL-10 brainstem levels is state-dependent, since the treatment did not have effects in the orofacial pain animals (all groups pain treated were similar – O, OV e OM), but, there was effects in the Sham (SV e SM are different of control group). It is

interesting to note that IL-10 is a central cytokine released during the resolution phase of inflammation that prevents tissue damage caused by infections and inflammations (Ouyang et al., 2011; Schunk et al., 2015). However, previous studies with CFA and TMD demonstrated elevated persistent inflammatory presence until six weeks after the CFA injection in rats (Spears et al., 2005; Nascimento, Leite-Panissi, 2014). We can suggest that the decreased IL-10 levels observed in our study may be linked to the fact of the inflammatory process is not in the resolution phase. Thus, we can suggest that orofacial pain and alcohol exposure create an unbalance in the homeostatic process difficulting the tissue repair of the effects of pain model and the possible damage alcohol-induced (Ouyang et al., 2011; Tabas and Glass, 2013).

## **5 CONCLUSION**

In summary, this study showed specific-tissue profiles of neuroimmunomodulators linked to pain conditions. However, surprisingly, our analysis showed alterations in the neuroimmunomodulators levels induced by orofacial pain and melatonin vehicle (ethanol 1%). We can suggest that the effects of melatonin and its vehicle in the mediators brainstem levels are state-dependent, since the treatment did not have effects in the orofacial pain animals (all groups pain treated are similar – O, OV e OM), but, there were effects in the Sham groups (SV e SM are different of control group). The effects induced by vehicle was an interesting result since demonstrated that a single alcohol administration was able to alter neuromodulators seven days after the injection. At the same time that this vehicle effect was a limitation for our study, it showed an interesting pharmacological data that should be considered when the researchers have to choose the vehicle that should be used in their studies, and in this way avoiding possible biases in their research. Additionally, this study showed that melatonin treatment exerts an antihyperalgesic effect in an animal model of orofacial inflammatory pain. This finding indicates the importance of



developing of studies that explore how an acute dose of melatonin improves analgesia at long-term in the inflammatory pain process.

#### Acknowledgements

This study was supported by the following Brazilian funding agencies: the National Council for Scientific and Technological Development, CNPq (I.L.S. Torres, V.L. Scarabelot, L.F. Medeiros, J.S. Freitas); the Committee for the Improvement of Higher Education Personnel, CAPES (C. de Oliveira, L.N.S Adachi, I.C. de Macedo); Graduate Research Group of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, GPPG (I.L.S. Torres, Grant 12-0104). FAPERGS/PRONEM (Dr. I.L.S. Torres, grant no. 11/2050). Grant Doc-Fix FAPERGS/CAPES/09-2012 (A. S. Quevedo).

#### REFERENCES

- Ambriz-Tututi, M., Granados-Soto, V., 2007. Oral and spinal melatonin reduces tactile allodynia in rats via activation of MT2 and opioid receptors. *Pain*. 132 (3), 273–280.
- Ambriz-Tututi, M., Rocha-González, H.I., Cruz, S.L., Granados-Soto, V., 2009. Melatonin: a hormone that modulates pain. *Life Sci*. 84(15-16), 489-498.
- Arreola-Espino, R., Urquiza-Marín, H., Ambriz-Tututi, M., Araiza-Saldaña, C.I., Caram-Salas, N.L., Rocha-González, H.I., Mixcoatl-Zecuatl, T., Granados-Soto, V., 2007. Melatonin reduces formalin-induced nociception and tactile allodynia in diabetic rats. *Eur J Pharmacol*. 577, 203–210.
- Bereiter, D.A., Okamoto, K., Bereiter, D.F., 2005. Effect of persistent monoarthritis of the temporomandibular joint region on acute mustard oil-induced excitation of trigeminal subnucleus caudalis neurons in male and female rats. *Pain*. 117, 58–67.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72, 248-54.

Caggiula, R., Epstein, L.H., Perkins, K.A., Saylor, S., 1995. Different methods of assessing nicotine-induced antinociception may engage different neural mechanisms. *Psychopharmacology.* 122(3), 301–306.

Caldeira, M.V., Melo, C.V., Pereira, D.B., Carvalho, R.F., Carvalho, A.L., Duarte, C.B., 2007. BDNF regulates the expression and traffic of NMDA receptors in cultured hippocampal neurons. *Mol Cell Neurosci.* 35(2), 208-219.

Campos, M.I.G., Campos, P.S.F., Line, S.R.P., 2006. Inflammatory cytokines activity in temporomandibular joint disorders: a review of literature. *Braz J Oral Sci.* 5 (18), 1054-1062.

Cardinali, D.P., García, A.P., Cano, P., Esquifino, A.I., 2004. Melatonin role in experimental arthritis. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord.* 4(1), 1-10.

Coiro, V., Vescovi, P.P., 1998. Alcoholism abolishes the effects of melatonin on growth hormone secretion in humans. *Neuropeptides.* 32(3), 211-214.

Cunali, P.A., Almeida, F.R., Santos, C.D., Valdrighi, N.Y., Nascimento, L.S., Dal'Fabbro, C., Tufik, S., Bittencourt, L.R., 2009. Prevalence of temporomandibular disorders in obstructive sleep apnea patients referred for oral appliance therapy. *J Orofac Pain.* 23(4), 339-344.

Detamore, M.S., Athanasiou, K.A., 2003. Structure and function of the temporomandibular joint disc: implications for tissue engineering. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 61(4), 494–506.

Dubrovsky, B., Raphael, K.G., Lavigne, G.J., Janal, M.N., Sirois, D.A., Wigren, P.E., Nemelivsky, L.V., Klausner, J.J., Krieger, A.C., 2014. Polysomnographic investigation of sleep and respiratory parameters in women with temporomandibular pain disorders. *J Clin Sleep Med.* 10(2), 195-201.

Filho, P.R., Vercelino, R., Cioato, S.G., Medeiros, L.F., Oliveira, C., Scarabelot, V.L., Souza, A., Rozisky, J.R., Quevedo, A. S., Adachi, L.N., Sanches, P.R., Fregni, F., Caumo, W., Torres, I.L., 2015. Transcranial direct current stimulation (tDCS) reverts behavioral alterations and brainstem BDNF level increase induced by neuropathic pain model: Long-lasting effect. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 64, 44-51.

Heffner, K.L., France, C.R., Trost, Z., Ng, H.M., Pigeon, W.R., 2011. Chronic low back pain, sleep disturbance, and interleukin-6. *Clin J Pain*. 27(1), 35-41.

Huang, F., He, H., Fan, W., Liu, Y., Zhou, H., Cheng, B., 2013. Orofacial inflammatory pain affects the expression of MT1 and NADPH-d in rat caudal spinal trigeminal nucleus and trigeminal ganglion. *Neural Regen Res*. 8(32), 2991-3002.

Ingawalé, S., Goswami, T., 2009. Temporomandibular joint: disorders, treatments, and biomechanics. *Ann Biomed Eng*. 37(5), 976-996.

Jing, Y.Y., Wang, J.Y., Li, X.L., Wang, Z.H., Pei, L., Pan, M.M., Dong, X.P., Fan, G.X., Yuan, Y.K., 2009. Nerve growth factor of red nucleus involvement in pain induced by spared nerve injury of the rat sciatic nerve. *Neurochem Res*. 34(9), 1612-1618.

Kilkenny, C., Browne, W.J., Cuthill, I.C., Emerson, M., Altman, D.G., 2010. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol*. 8(6), 1-6.

Kim, S.H., Son, C.N., Lee, H.J., Cho, H.C., Jung, S.W., Hur, J.A., Baek, W.K., Jung, H.R., Hong, J.H. 2015. Infliximab partially alleviates the bite force reduction in a mouse model of temporomandibular joint pain. *J Korean Med Sci*. 30(5):552-558.

Kumar, S., Porcu, P., Werner, D.F., Matthews, D.B., Diaz-Granados, J.L., Helfand, S., Morrow, A.L., 2009. The role of GABA(A) receptors in the acute and chronic effects of ethanol: a decade of progress. *Psychopharmacology (Berl)* 205, 529–564.

Laste, G., Macedo, I. C., Rozisky, J. R., Silva, F. R., Caumo, W., Torres, I.L.S., 2012. Melatonin administration reduces inflammatory pain in rats. *Journal of Pain Research*. 5, 359–362.

Laste, G., Vidor, L., de Macedo, I.C., Rozisky, J.R., Medeiros, L., de Souza, A., Meurer, L., de Souza, I.C., Torres, I.L., Caumo, W., 2013. Melatonin treatment entrains the rest-activity circadian rhythm in rats with chronic inflammation. *Chronobiol Int*. 30(9),1077-1088.

Laste, G., Ripoll Rozisky, J., Caumo, W., Lucena da Silva Torres, I., 2015. Short- but Not Long-Term Melatonin Administration Reduces Central Levels of Brain-Derived Neurotrophic Factor in Rats with Inflammatory Pain. *Neuroimmunomodulation*. Apr 11.Epub ahead of print.

Li, J.G., Lin, J.J., Wang, Z.L., Cai, W.K., Wang, P.N., Jia, Q., Zhang, A.S., Wu, G.Y., Zhu, G.X., Ni, L.X., 2015. Melatonin attenuates inflammation of acute pulpitis subjected to dental pulp injury. *Am J Transl Res*. 7(1), 66-78.

Lopez-Canul, M., Palazzo, E., Dominguez-Lopez, S., Luongo, L., Lacoste, B., Comal, S., Angeloni, D., Frascini, F., Boccella, S., Spadoni, G., Bedini, A., Tarzia, G., Maione, S., Granados-Soto, V., Gobbi, G. 2015. Selective melatonin MT2 receptor ligands relieve neuropathic pain through modulation of brainstem descending antinociceptive pathways. *Pain*. 156, 305–317.

Maleki, N., Garjani, A., Nazemiyeh, H., Nilfouroushan, N., Eftekhar Sadat, A.T., Allameh, Z., Hasannia, N. 2001. Potent anti-inflammatory activities of hydroalcoholic extract from aerial parts of *Stachys inflata* on rats. *Ethnopharmacol*. 75, 213–218.

Merighi, A., Salio, C., Ghirri, A., Lossi, L., Ferrini, F., Betelli, C., Bardoni, R. 2008. BDNF as a pain modulator. *Prog Neurobiol*. 85, 297–317.

Morgan, P.J., Barret, P., Howell, E., Helliwell, R., 1994. Melatonin receptors: localization, molecular pharmacology and physiological significance. *Neurochem Int*. 24(2), 101-146.

Nascimento, G.C., Leite-Panissi, C.R.A., 2014. Time-dependent analysis of nociception and anxiety-like behavior in rats submitted to persistent inflammation of the temporomandibular joint. *Physiology & Behavior*. 125, 1–7.

Netto, C.A., Siegfried, B., Izquierdo, I., 1987. Analgesia induced by exposure to a novel environment in rats: effect of concurrent and post-training stressful stimulation. *Behav Neural Biol*. 48(2), 304–309.

Nosedá, R., Hernández, A., Valladares, L., Mondaca, M., Laurido, C., Soto-Moyano, R., 2004. Melatonin-induced inhibition of spinal cord synaptic potentiation in rats is MT2 receptor-dependent. *Neuroscience Letters*. 360 (1–2), 41–44.

Okamoto, K., Tashiro, A., Hirata, H., Bereiter, D.A., 2005. Differential modulation of TMJ neurons in superficial laminae of trigeminal subnucleus caudalis/upper cervical cord junction region of male and cycling female rats by morphine. *Pain*. 114, 203–211.

Ossipov, M.H., Kovelowski, C.J., Nichols, M.L., Hruby, V.J., Porreca, F., 1995. Characterization of supra spinal antinociceptive actions of opioid delta agonists in the rat. *Pain*. 62(3), 287–293.

Ouyang, W., Rutz, S., Crellin, N.K., Valdez, P.A., Hymowitz, S.G. 2011. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annu Rev Immunol*. 29, 71-109.

Peimani, A., Sardary, F., 2014. Effect of Low Level Laser on Healing of Temporomandibular Joint Osteoarthritis in Rats. *J Dent (Tehran)*. 11(3), 319-327.

Pezet, S., Onténiente, B., Grannec, G., Calvino, B., 1999. Chronic pain is associated with increased TrkA immunoreactivity in spinoreticular neurons. *J Neurosci*. 19(13), 5482-5492.

Raivio, N., Tiraboschi, E., Saarikoski, S.T., Castrén, E., Kiianmaa, K., 2012. Brain-derived neurotrophic factor expression after acute administration of ethanol. *Eur J Pharmacol*. 687(1-3), 9-13.

Reiter, R.J., Paredes, S.D., Manchester, L.C., Tan, D.X., 2009. Reducing oxidative/nitrosative stress: a newly-discovered genre for melatonin. *Crit Rev. Biochem Mol Biol.* 44(4), 175–200.

Rubinstein, M., Mogil, J.S., Japón, M., Chan, E.C., Allen, R.G., Low, M.J., 1996. Absence of opioid stress-induced analgesia in mice lacking beta-endorphin by site-directed mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(9), 3995–4000.

Schunck, R.V., Torres, I.L., Laste, G., de Souza, A., Macedo, I.C., Valle, M.T., Salomón, J.L., Moreira, S., Kuo, J., Arbo, M.D., Dallegrave, E., Leal, M.B., 2015. Protracted alcohol abstinence induces analgesia in rats: Possible relationships with BDNF and interleukin-10. *Pharmacol Biochem Behav.* 135, 64-69.

Smith, M.T., Wickwire, E.M., Grace, E.G., Edwards, R.R., Buenaver, L.F., Peterson, S., Klick, B., Haythornthwaite, J.A., 2009. Sleep disorders and their association with laboratory pain sensitivity in temporomandibular joint disorder. *Sleep.* 32(6), 779-790.

Spears, R., Dees, L.A., Sapozhnikov, M., Bellinger, L.L., Hutchins, B., 2005. Temporal changes inflammatory mediator concentrations in an adjuvant model of temporomandibular joint inflammation. *J Orofac Pain.* 19, 34–40.

Spezia Adachi, L.N.S., Caumo, W., Laste, G., Medeiros, L.F., Rozisky, J.R., Souza, A., Fregni, F., Torres, I.L.S., 2012. Reversal of chronic stress-induced pain by transcranial direct current stimulation (tDCS) in an animal model. *Brain Research.* 1489, 17–26.

Spezia Adachi, L.N.S., Quevedo, A., Souza, A., Scarabelot, V.L., Rozisky, J.R., Oliveira, C., Marques, P., Medeiros, L.F., Fregni, F., Caumo, W., Torres, I.L.S., 2015. Exogenously induced brain activation regulates neuronal activity by top-down modulation: conceptualized model for electrical brain stimulation. *Exp Brain Res.* 233(5), 1377-1389.

Srinivasan, V., Zakaria, R., Jeet Singh, H., Acuna-Castroviejo, D., 2012. Melatonin and its agonists in pain modulation and its clinical application. *Arch Ital Biol.* 150(4), 274-289.

Tabas, I. Glass, C.K. 2013. Anti-inflammatory therapy in chronic disease: challenges and opportunities. *Science*. 339(6116), 166-172.

Tao, W., Chen, Q., Zhou, W., Wang, Y., Wang, L., Zhang, Z. 2014. Persistent inflammation-induced up-regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) promotes synaptic delivery of  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor GluA1 subunits in descending pain modulatory circuits. *JBiol Chem*. 289(32), 22196-22204.

Vanecek, J., 1998. Cellular mechanisms of melatonin action. *Physiological Reviews*. 78(3), 687–721.

Vidor, L.P., Torres, I.L.S., de Souza, I.C.C., Fregni, F., Caumo, C., 2013. Analgesic and Sedative Effects of Melatonin in Temporomandibular Disorders: A Double-Blind, Randomized, Parallel-Group, Placebo-Controlled Study. *J Pain Symptom Manage*. 46(3), 422-432.

Wang, S., Zhang, L., Lim, G., Sung, B., Tian, Y., Chou, C.W., Hernstadt, H., Rusanescu, G., Ma, Y. and Mao, J.A., 2009. Combined Effect of Dextromethorphan and Melatonin on Neuropathic Pain Behavior in Rats. *Brain Research*, 1288, 42-49.

Wang, Z.Y., Miki, T., Lee, K.Y., Yokoyama, T., Kusaka, T., Sumitani, K., Warita, K., Matsumoto, Y., Yakura, T., Hosomi, N., Ameno, K., Bedi, K.S., Takeuchi, Y., 2010. Short-term exposure to ethanol causes a differential response between nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor ligand/receptor systems in the mouse cerebellum. *Neuroscience*. 165(2):485-491.

Weaver, D.R., Rivkees, S.A., Reppert, S.M., 1989. Localization and characterization of melatonin receptors in rodent brain by in vitro autoradiography. *Journal of Neurosciences*. 9(7), 2581–2590.

Williams, L.M., Hannah, L.T., Hastings, M.H., Maywood, E.S., 1995. Melatonin receptors in the rat brain and pituitary. *Journal of Pineal Research*. 19(4), 173–177.

Wilhelmsen, M., Amirian, I., Reiter, R.J., Rosenberg, J., Gögenur, I., 2011. Analgesic effects of melatonin: a review of current evidence from experimental and clinical studies. *J Pineal Res.* 51(3), 270-277.

Yamasaki, Y., Ren, K., Shimada, M., Iwata, K. 2008. Modulation of paratrigeminal nociceptive neurons following temporomandibular joint inflammation in rats. *Exp Neurol.* 214(2), 209–218.

Zaringhalam, J., Manaheji, H., Mghsoodi, N., Farokhi, B., Mirzaiee, V., 2008. Spinal mu-opioid receptor expression and hyperalgesia with dexamethasone in chronic adjuvant arthritis rats. *Clin Exp Pharmacol Psysio.* 35, 1309–1315.

Zhang, L., Zhang, H.Q., Liang, X.Y., Zhang, H.F., Zhang, T., Liu, F.E., 2013. Melatonin ameliorates cognitive impairment induced by sleep deprivation in rats: role of oxidative stress, BDNF and CaMKII. *Behav Brain Res.* 256, 72-81.

Zhao, J., Seereeram, A., Nassar, M.A., Levato, A., Pezet, S., Hathaway, G., Morenilla-Palao, C., Stirling, C., Fitzgerald, M., McMahon, S.B., Rios, M., Wood, J.N., 2006. Nociceptor-derived brain-derived neurotrophic factor regulates acute and inflammatory but not neuropathic pain. *Mol Cell Neurosci.* 31, 539–548.



## Legends

**Figure 1.** Experimental design. The animals were adapted 24h before to nociceptive tests to avoid analgesia induced by the stress of novelty. VF (Von Frey test); HP (Hot Plate test).

## Figure 2.

**Panel A.** Effect of melatonin on the mechanical hyperalgesia response in an orofacial pain model at different timepoints measured by the Von Frey test. Data are presented as the mean±SEM, (N=35). Total Control group (C); Saline-vehicle group (SV); Saline- Melatonin group (SM); Orofacial pain group (O); Orofacial pain-vehicle group (OV); Orofacial pain-Melatonin group (OM).

**a** Different from the groups C, SV and SM; **b** Different from the C, SV and SM; **c** Different from the C, SV, SM and OM; **d** Different from the C, SV, SM, O and OV; **e** Different from the C, SV, SM and OM; **f** Different from the C, SV, SM, O and OV; **g** Different from the C, SV, SM and OM; **h** Different from the C, SV, SM, O and OV; **i** Different from the C, O, OV and OM; **j** Different from the C, SV, SM and OM; **h** Different from the C, SV, SM, O and OV;

GEE: Wald  $\chi^2 = 29,456.31; 29, P < 0.001$ .

**Panel B.** Effect of melatonin on thermal hyperalgesia response in an orofacial pain model at different timepoints measured by the Hot Plate test. Data are presented as the mean±SEM (N=35).

**a** Different from the groups C, SV and SM; **b** Different from the C, SV, SM and OM; **c** Different from the C, SV, SM and OM; **d** Different from the C, SV, SM, O and OV; **e** Different from the C, SV, SM and OM; **f** Different from the C, SV, SM and OM; **g** Different from the C, SV and SM.

GEE: Wald  $\chi^2 = 4.72; 32, P < 0.001$ .

## Figure 3.

**Panel A.** Brainstem BDNF levels. Data are presented as Mean $\pm$ SEM. Total Control group (C); Saline-vehicle group (SV); Saline-Melatonin group (SM); Orofacial pain group (O); Orofacial pain-vehicle group (OV); Orofacial pain-Melatonin group (OM).

\* Different from all other groups, seven days after melatonin. One-way ANOVA/SNK,  $F_{(5,30)}=27.35$ ,  $P<0.01$ .

**Panel B.** Brainstem NGF levels. Data are presented as Mean $\pm$ SEM.

\* Different from C group seven days after melatonin.

§ Different from C, SM, O and OV. One-way ANOVA/SNK,  $F_{(5,26)}=18.01$ ,  $P<0.01$ .

**Panel C.** Brainstem IL-6 levels. Data are presented Mean $\pm$ SEM.

\* Different from CT group, seven days after melatonin.

§ Different from CT, SM, OV and OM groups seven days after melatonin. One-way ANOVA/SNK,  $F_{(5,26)}=6.39$ ,  $P<0.01$ .

**Panel D.** Brainstem IL-10 levels. Data are presented Mean $\pm$ SEM.

\* Different from control group, seven days after melatonin. One-way ANOVA/SNK,  $F_{(5,29)}=5.34$ ,  $P<0.01$ .

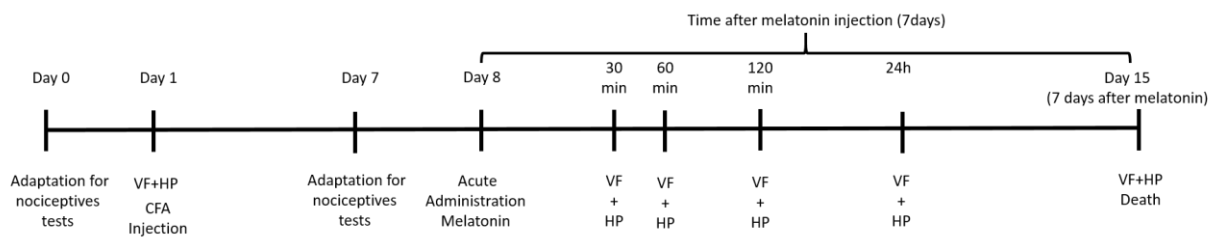
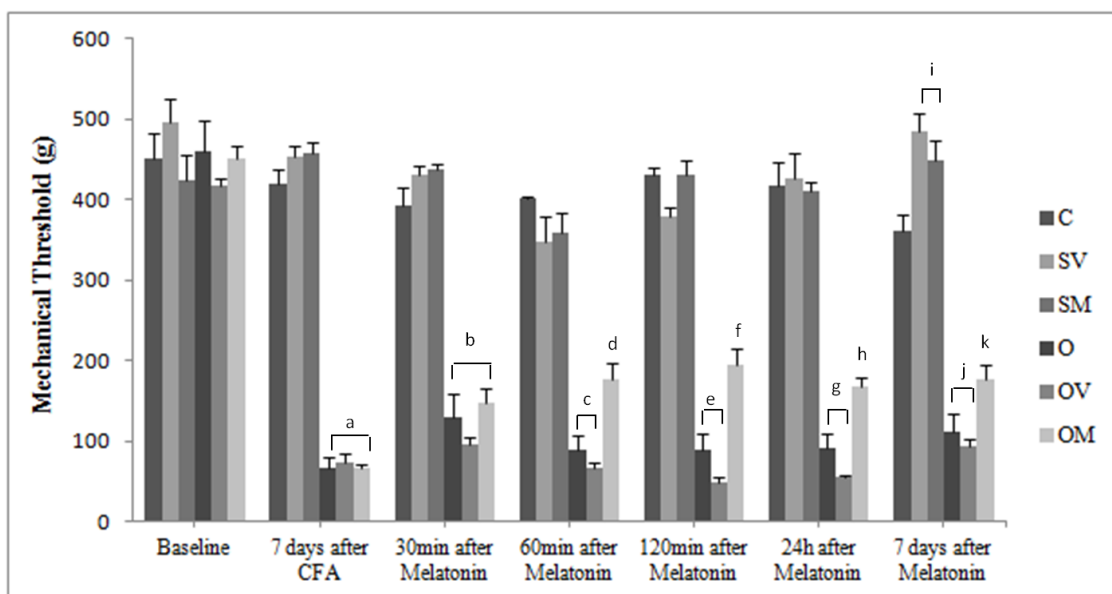
**Figure 1**

Figure 2

## PANEL A



## PANEL B

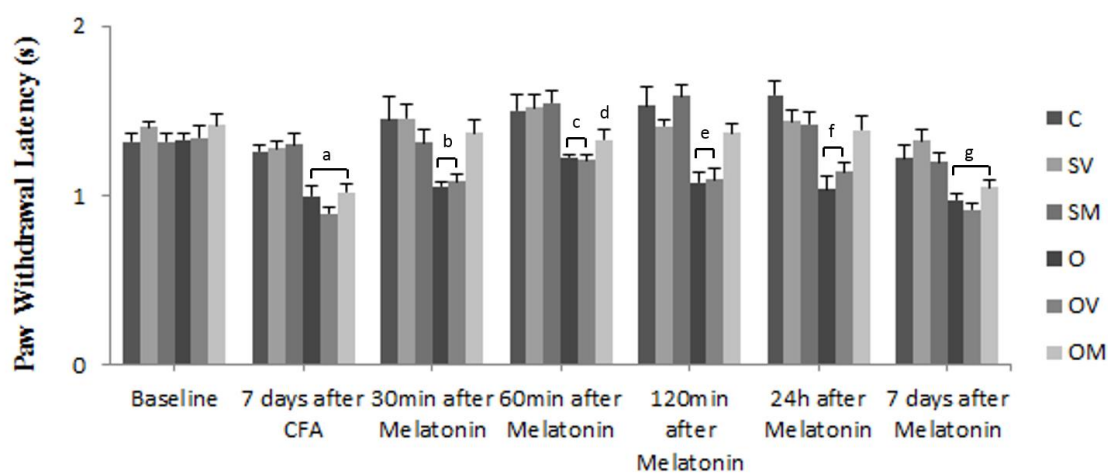
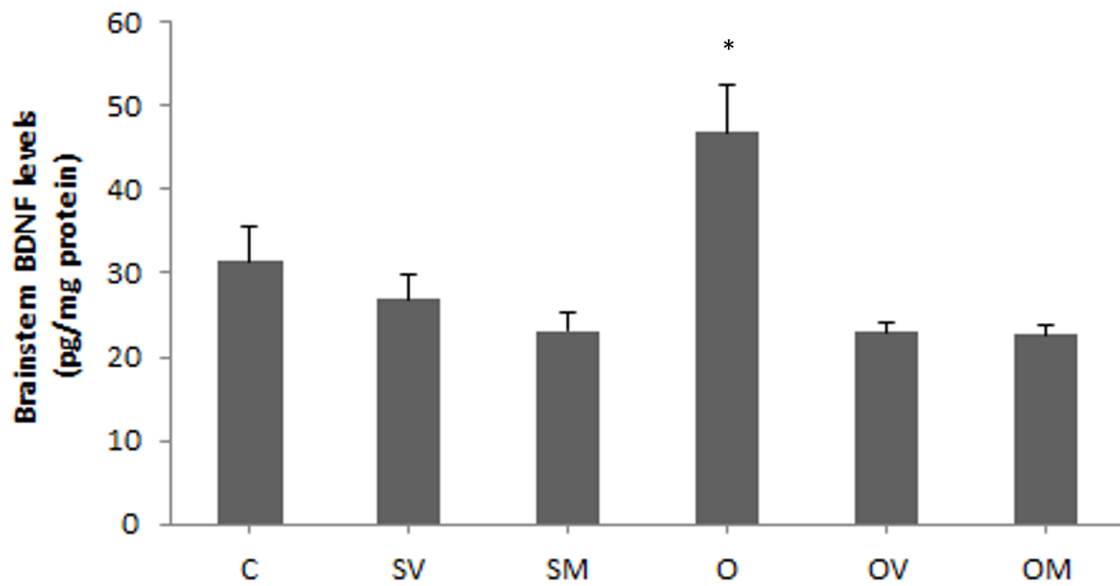
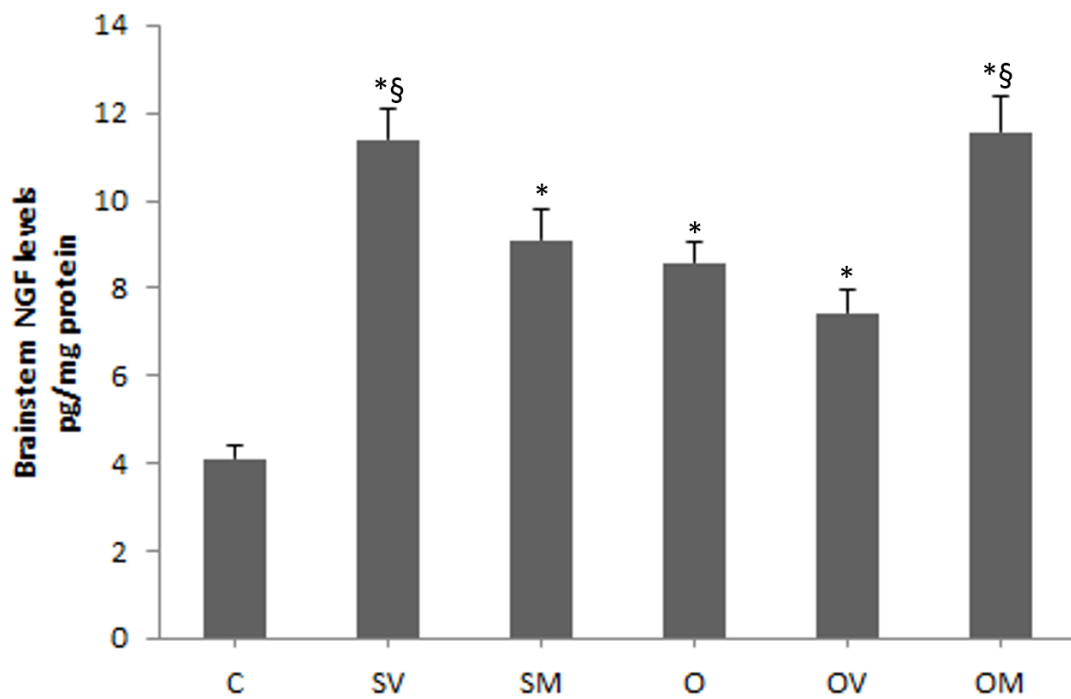


Figure 3

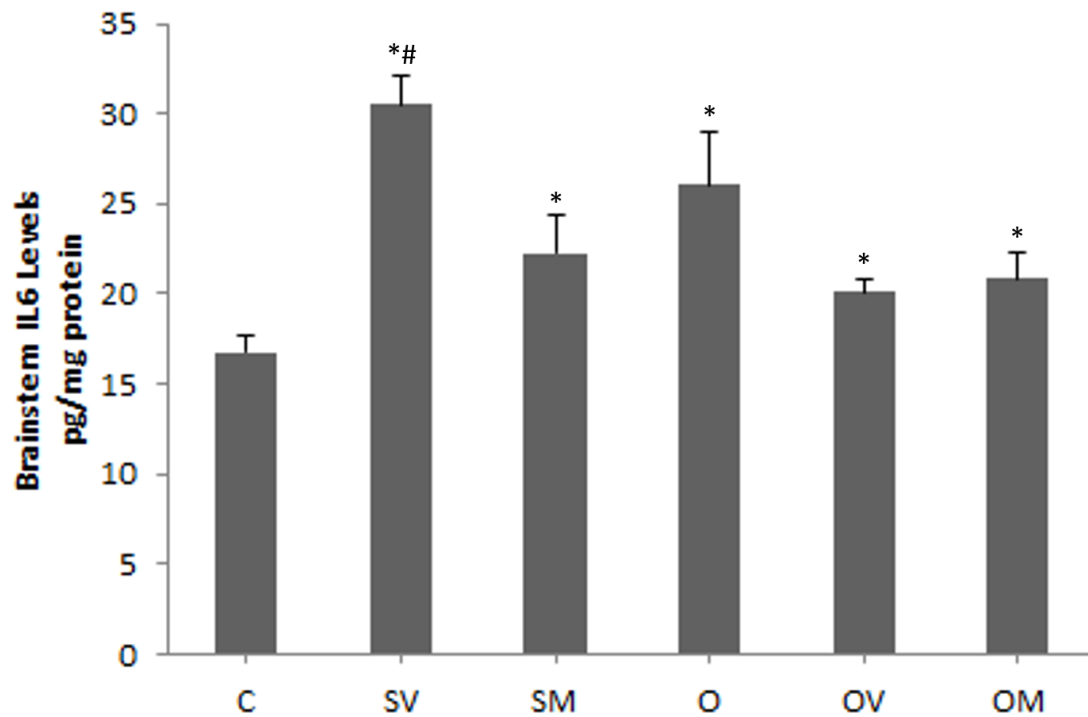
PANEL A



PANEL B



## PANEL C



## PANEL D

