

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

CAMILA LINO DE OLIVEIRA

**BAIXAS DOSES DE NALTREXONA EM MODELO DE DOR NEUROPÁTICA  
TRIGEMINAL EM RATOS**

PORTO ALEGRE

2019

CAMILA LINO DE OLIVEIRA

**BAIXAS DOSES DE NALTREXONA EM MODELO DE DOR NEUROPÁTICA  
TRIGEMINAL EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre, em Farmacologia e Terapêutica.

Orientadora: Prof. Dra. Andressa de Souza

**PORTO ALEGRE**

**2019**

CIP - Catalogação na Publicação

Lino de Oliveira, Camila  
Baixas doses de naltrexona em modelo de dor  
neuropática trigeminal em ratos / Camila Lino de  
Oliveira. -- 2019.  
110 f.  
Orientadora: Andressa de Souza.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da  
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Biológicas: Farmacologia e Terapêutica, Porto Alegre,  
BR-RS, 2019.

1. Neuralgia Trigeminal . 2. Naltrexona. 3. Toll  
like Receptor 4. 4. Ratos. I. de Souza, Andressa,  
orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os  
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

## **BANCA EXAMINADORA**

Dra. Patrícia Pereira  
(PPGFT - UFRGS)

Dr. Alexandre Quevedo  
(PPGODO - UFRGS)

Dra. Juliana da Silva  
(PPG Saúde e Desenvolvimento Humano - Universidade La Salle)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha professora orientadora Dra. Andressa de Souza, pela paciência, confiança e dedicação por toda essa jornada.

À minha co-orientadora Dra. Iraci Lucena da Silva Torres, pelas contribuições nesse trabalho, pelo conhecimento compartilhado e por me oportunizar fazer parte do seu grupo de pesquisa.

Ao meu amor, Vinicius Souza dos Santos, meu principal incentivador, obrigada por toda compreensão e amor sempre!

À minha família, minha mãe Ângela, meus irmãos Amanda e Gustavo, meus sogros Antonio e Vilanda e Vó Leci, por estarem sempre ao meu lado incentivando e dando suporte logístico, emocional e sentimental!

À professora Dra. Liciane Fernandes Medeiros pelos ensinamentos, paciência e empenho para concretização deste trabalho.

Aos queridos colegas e parceiros Ms. Vanessa Silva de Souza, Ms. Bettega Costa Lopes e Ms. Fabricio Finamor, que foram fundamentais na execução deste trabalho.

Aos demais colegas e amigos do Laboratório de Farmacologia da Dor e Neuromodulação: Investigações Pré-clínicas pelo ótimo convívio e contribuições ao longo desse período.

Ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre – GPPG/HCPA, pelo apoio financeiro para o desenvolvimento do projeto (2017-0575) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de mestrado durante minha formação.

A todos os profissionais da Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em especial à Marta, Tuane e Daniela por todo suporte para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica/UFRGS pelos ensinamentos compartilhados durante o mestrado.

A Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica (PPGFT) por me possibilitarem desenvolver este trabalho.

## EPÍGRAFE

*Livros não mudam o mundo, quem muda o mundo são as pessoas.*

*Os livros só mudam as pessoas.*

Mario Quintana

## RESUMO

Neuralgia trigeminal (NT) é quadro de neuropatia que afeta o nervo trigêmeo, a dor se apresenta de forma paroxística, e que surge de forma abrupta, inesperada e com curta duração, podendo ocorrer várias vezes ao dia. NT não tem cura e seu tratamento baseia-se em medicamentos para o seu alívio. O tratamento de escolha são fármacos anticonvulsivantes, sendo carbamazepina o padrão-ouro. Apesar de proporcionar alívio da dor em poucos dias, apresenta importantes efeitos colaterais, como efeitos antimuscarínicos, cansaço, sonolência e náuseas. Novas opções terapêuticas tem sido buscada para o tratamento da NT. A naltrexona é um antagonista competitivo dos receptores opioides, e quando utilizada em baixas doses, exibe propriedades paradoxais, como analgesia e efeitos anti-inflamatórios. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do tratamento com baixas doses de naltrexona, sobre o limiar de hiperalgisia mecânica de ratos submetidos a um modelo cirúrgico de NT. Carbamazepina foi utilizada como fármaco padrão ouro no tratamento da NT. Cinquenta e nove ratos Wistar machos adultos foram randomizados por peso em sete grupos: Grupo Controle, *Sham* dor + veículo, *Sham* dor + carbamazepina (100mg/kg), *Sham* dor + naltrexona (0,5mg/kg), Dor + veículo, Dor + carbamazepina (100mg/kg) e Dor + naltrexona (0,5mg/kg). O modelo de NT utilizado foi a cirurgia de constrição crônica do nervo infraorbitário. Além disso, observamos o impacto deste tratamento nos níveis de BDNF, IL-10, TNF-  $\alpha$  e TLR4, em tronco encefálico e medula espinhal. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (GPPG-HCPA protocolo número 2017-0575). Para avaliação do limiar de hiperalgisia mecânica foi utilizado o teste de Von Frey facial, que foi realizado início do estudo, 7 e 14 dias após a cirurgia, 1 hora após e 24 horas após a primeira dose do tratamento e 1 hora após a última dose do tratamento. O tratamento teve a duração de 10 dias em que os fármacos foram administrados por gavagem uma vez ao dia. Os níveis de BDNF, IL-10, TNF-  $\alpha$  e TLR4 foram avaliados pelo método de ELISA. Nossos resultados mostraram que o limiar de hiperalgisia mecânica facial foi semelhante entre os grupos no início do estudo (GEE,  $P > 0,05$ ), no entanto, 7 dias após a cirurgia, os ratos dos grupos *sham* e dor apresentaram menor limiar de hiperalgisia mecânica facial do que o grupo controle (GEE,  $P < 0,05$ ). Quatorze dias após a cirurgia, apenas os grupos com dor apresentaram menor limiar de hiperalgisia mecânica facial, caracterizando o modelo NT, e os tratamentos farmacológicos foram iniciados. A primeira dose de carbamazepina ou baixas doses de naltrexona reverteram parcialmente o limiar de hiperalgisia mecânica facial, entretanto, após 10 dias de tratamento, ambos os fármacos reverteram totalmente o limiar de

hiperalgesia mecânica. Além disso, os níveis de BDNF e IL-10 em medula espinhal foram modulados por baixas doses de naltrexona diferentemente nos grupos *sham* e dor. Portanto, o tratamento com baixas doses de naltrexona pode ser uma opção para aliviar a dor neuropática trigeminal, no entanto, estudos adicionais são necessários para entender os mecanismos exatos do efeito analgésico das baixas doses de naltrexona.

Palavras- chave: Neuralgia trigeminal; Naltrexona; Toll like Receptor 4; Ratos.



## ABSTRACT

Trigeminal neuralgia (TN) is a condition of neuropathy that affects the trigeminal nerve, pain is paroxysmal, and comes on abruptly, unexpectedly and with short duration, and may occur several times a day. TN has no cure and its treatment is based on medicines for your relief. The treatment of choice is anticonvulsant drugs, with carbamazepine being the gold standard. Although it provides pain relief within a few days, it has important side effects such as antimuscarinic effects, tiredness, drowsiness and nausea. New therapeutic options have been sought for the treatment of TN. Naltrexone is a competitive opioid receptor antagonist and when used at low doses exhibits paradoxical properties such as analgesia and anti-inflammatory effects. The aim of this study was to evaluate the effect of low-dose naltrexone treatment on the mechanical hyperalgesia threshold of rats submitted to a TN surgical model. Carbamazepine was used as the gold standard drug in the treatment of TN. Fifty-nine adult male Wistar rats were randomized by weight into seven groups: Control Group, Sham pain + vehicle, Sham pain + carbamazepine (100mg/kg), Sham pain + naltrexone (0.5mg/kg), Pain + vehicle, Pain + carbamazepine (100mg/kg) and Pain + naltrexone (0.5mg/kg). The TN model used was chronic constriction surgery of the infraorbital nerve. In addition, we observed the impact of this treatment on BDNF, IL-10, TNF- $\alpha$  and TLR4 levels in the brainstem and spinal cord. This study was approved by the Animal Use Ethics Committee (CEUA) of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (GPPG-HCPA protocol number 2017-0575). Mechanical von Frey test was used to assess the mechanical hyperalgesia threshold, which was performed at baseline, 7 and 14 days after surgery, 1 hour after and 24 hours after the first dose of treatment and 1 hour after the last dose. of treatment. The treatment lasted 10 days when the drugs were administered by gavage once a day. BDNF, IL-10, TNF- $\alpha$  and TLR4 levels were assessed by the ELISA method. Our results showed that the facial mechanical hyperalgesia threshold was similar between the groups at baseline (GEE,  $P > 0.05$ ), however, 7 days after surgery, the sham and pain rats presented lower hyperalgesia threshold. facial mechanics than the control group (GEE,  $P < 0.05$ ). Fourteen days after surgery, only groups with pain had lower threshold of facial mechanical hyperalgesia, characterizing the TN model, and pharmacological treatments were started. The first dose of carbamazepine or low doses of naltrexone partially reversed the facial mechanical hyperalgesia threshold; however, after 10 days of treatment, both drugs fully reversed the mechanical hyperalgesia threshold. In addition, spinal cord BDNF and IL-10 levels were modulated by low doses of naltrexone differently in the sham and pain groups. Therefore, low-dose naltrexone treatment may be an option to relieve trigeminal neuropathic pain, however,

further studies are needed to understand the exact mechanisms of the analgesic effect of low-dose naltrexone.

Keywords: Trigeminal neuralgia; Naltrexone; Toll like Receptor 4; Rats.

## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1. Fluxograma das pesquisas realizadas nas principais bases de dados..... 22

## LISTA DE ABREVIATURAS

BDNF - Fator neurotrófico derivado do cérebro (do inglês *brain-derived neurotrophic factor*)

FDA – Administração de comidas e remédios (do inglês *food and Drugs Administration*)

GABA - Ácido gama-aminobutírico (do inglês *gamma-aminobutyric acid*)

HCPA – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

IASP - Associação Internacional para Estudos da Dor

IL1- $\beta$  - Interleucina 1- $\beta$

IL-6 – Interleucina 6

IL-10 - Interleucina 10

LDN – Baixas doses de naltrexona (do inglês *Low dose naltrexone*)

NMDA: N-metil D-Aspartato

NT - Neuralgia Trigeminal

SNC – Sistema nervoso central

TLR4 – Receptor Toll like 4 (do inglês *Toll like receptor 4*)

TNF- $\alpha$  – Fator de necrose tumoral alfa (do inglês *tumor necrosis factor*)

## SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO .....	14
1 INTRODUÇÃO .....	17
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1 ESTRATÉGIAS PARA LOCALIZAR E SELECIONAR INFORMAÇÕES .....	20
2.2 DOR NEUROPÁTICA.....	22
2.3 NEURALGIA DO TRIGÊMEO .....	23
2.4 TRATAMENTOS DISPONÍVEIS PARA NEURALGIA DO TRIGÊMEO.....	24
2.5 NALTREXONA.....	25
2.6 BIOMARCADORES.....	27
3 JUSTIFICATIVA .....	30
4 HIPÓTESE .....	32
5 OBJETIVOS.....	34
5.1 OBJETIVO GERAL.....	34
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
6.1 ARTIGO 1 .....	37
6.2 ARTIGO 2 .....	56
7 DISCUSSÃO GERAL .....	89
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	94
9 PERSPECTIVAS FUTURAS .....	96
10 REFERÊNCIAS.....	98
11 APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS .....	109
12 PRODUÇÃO ACADÊMICA DURANTE O MESTRADO.....	111

## APRESENTAÇÃO

Essa dissertação está estruturada em 3 partes:

- Parte I - Introdução, Revisão da Literatura, Justificativa, Hipótese e Objetivos;
  
- Parte II - Materiais e Métodos, Resultados e Discussão na forma de dois artigos científicos: o primeiro caracterizando o modelo de neuralgia trigeminal e o segundo; avaliando os efeitos do tratamento com baixas doses de naltrexona em ratos submetidos ao modelo de neuralgia trigeminal e os níveis de BDNF, IL-10, TNF –  $\alpha$  e TLR4 em tronco encefálico e medula espinhal.
  
- **Artigo 1:** Modelo de dor neuropática trigeminal em ratos.
  
- **Artigo 2:** Evidence of low dose of naltrexone in relieving of trigeminal pain in rats.
  
- Parte III – Discussão Geral, Perspectivas futuras, Conclusões, Referências, Aprovação da Comissão de Ética e a Produção Acadêmica Durante o Período de Mestrado.

# **PARTE I**

---

## **INTRODUÇÃO**



## 1 INTRODUÇÃO

A neuralgia trigeminal (NT) é quadro de dor neuropática que afeta o V (quinto) par craniano (nervo trigêmeo) caracterizada como uma dor lancinante repentina, descrita como insuportável, semelhante a um choque elétrico, desencadeada por estímulos em pontos gatilhos na face (Love and Coakham 2001). O nervo trigêmeo é um nervo misto, com predomínio da função sensitiva, sendo responsável pela inervação da face e cavidade oral. A porção sensitiva é subdividida em três ramos: oftálmico (V1), maxilar (V2) e mandibular (V3) (Leclercq et al. 2013). A dor é unilateral, sendo o lado direito do rosto envolvido com mais frequência do que o esquerdo e se dissemina pelas divisões do nervo trigêmeo, frequentemente sobre os ramos maxilar e mandibular (Cruccu et al. 2006). É mais prevalente em mulheres do que em homens (Kirkpatrick 1989). Em geral, a NT apresenta incidência de 12,6 a 27/100.000 habitantes, sendo mais frequentemente após os 60 anos (Costa and Leite 2015).

O diagnóstico da NT é exclusivamente clínico, baseia-se no relato do paciente, uma vez que não há exames específicos para sua identificação ou comprovação. Para definir o diagnóstico, o paciente precisa descrever duas condições relevantes: a dor deve ser paroxística, ou seja, tem início e término repentino, e deve ser na região inervada pelo nervo trigêmeo (Singh 2016).

NT não tem cura e seu tratamento baseia-se no uso de fármacos para o seu alívio. De acordo com as diretrizes de tratamento baseado em evidências clínicas, o tratamento de escolha são os fármacos anticonvulsivantes, sendo primeira linha de tratamento a carbamazepina ou oxcarbazepina (Zakrzewska 2009). Tanto carbamazepina como oxcarbazepina são relacionados a efeitos colaterais centrais como ataxia, confusão, desequilíbrio e sonolência (Krafft 2008). Efeitos periféricos como xerostomia, aumento de peso, constipação e retenção urinária são mais frequentes com o uso da carbamazepina do que com a oxcarbazepina (Maarbjerg et al. 2017). Considerando estes fatores, tem sido buscadas novas opções terapêuticas no tratamento da neuralgia trigeminal, entre elas, baclofen e lamotrigina (Cruccu et al. 2008), e mais recentemente o uso de baixas doses de naltrexona.

Naltrexona possui estrutura e funcionamento semelhante ao antagonista opioide naloxona, no entanto, apresenta maior biodisponibilidade oral e tempo maior de meia-vida (Pharmacology 1975). Utilizada em baixas doses, a naltrexona exhibe propriedades paradoxais, como analgesia e efeitos anti-inflamatórios, que não foram relatadas em

dosagens maiores. Em doses orais de 50-100 mg, pode reverter dependência a opioides e ao álcool (Hanka 1996). Além disso, tem sido descrito que baixas doses de naltrexona podem reduzir a gravidade dos sintomas na fibromialgia, esclerose múltipla e síndrome da dor regional complexa (Younger et al. 2014).

Seu mecanismo de ação ocorre pelo bloqueio de receptores opioides  $\mu$ , induzindo aumento da síntese e liberação de opioides, que podem ativar os receptores opioides  $\kappa$  (Segal et al. 2014). A ativação de receptores opioides  $\kappa$  tem efeito anti-inflamatório diminuindo os níveis de interleucina-6 (IL-6) e migração de neutrófilos (Segal et al. 2014). Em baixas doses, a naltrexona também atua sobre os receptores não opioides, como o receptor *Toll like 4* (TLR4), que são encontrados na micróglia, que constitui cerca de 70% do SNC (Brown and Panksepp 2009). O bloqueio de receptores TLR4 inibe a liberação de citocinas pró-inflamatórias, substância P, óxido nítrico, aminoácidos excitatórios e fator de necrose tumoral (TNF -  $\alpha$ ) e pode conduzir à regulação negativa da expressão do receptor de quimiocina e da molécula de adesão (Younger et al. 2014).

Baseando-se na necessidade de novas terapias para o tratamento da neuralgia trigeminal, nesta dissertação buscou-se avaliar os efeitos do tratamento com baixas doses de naltrexona em um modelo de neuralgia trigeminal em ratos.

---

**REVISÃO DE LITERATURA**

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 ESTRATÉGIAS PARA LOCALIZAR E SELECIONAR INFORMAÇÕES

Para realização desta revisão de literatura buscou-se apresentar os principais aspectos relacionados à neuralgia do trigêmeo e naltrexona, relacionando-os com os principais achados do nosso estudo. A estratégia de busca envolveu as seguintes bases de dados: PubMed, LILACS e Embase. Somente estudos com animais e publicações nos últimos 15 anos foram selecionadas (2004 a 2019), sendo que livros e monografias também foram consultadas para esclarecimentos de assuntos de interesse. Nos sites PubMed, LILACS e Embase foram realizadas buscas utilizando-se as seguintes palavras-chave: *trigeminal neuralgia*, *naltrexone*, *nociception*, *toll like receptor 4* e *BDNF*. Utilizando-se o termo *trigeminal neuralgia* foram encontrados 282 artigos no PubMed, 4 no LILACS e 339 no Embase. Já com o descritor *naltrexone* foram encontrados 1828 artigos no PubMed, 6 no LILACS e 1169 no Embase. Enquanto que para *nociception* foram encontrados 5865 artigos no PubMed, 137 no LILACS, 17104 no Embase. Quanto à pesquisa de artigos utilizando como descritores *toll like receptor 4* e *BDNF*, foram encontrados 9282 e 11299 artigos no PubMed, 20 e 20 no LILACS, 9824 e 10665 no Embase, respectivamente. Refinando-se a busca por meio de cruzamentos entre as palavras-chave acima, foram encontrados um número reduzido de publicações, conforme demonstrado na Figura 1.

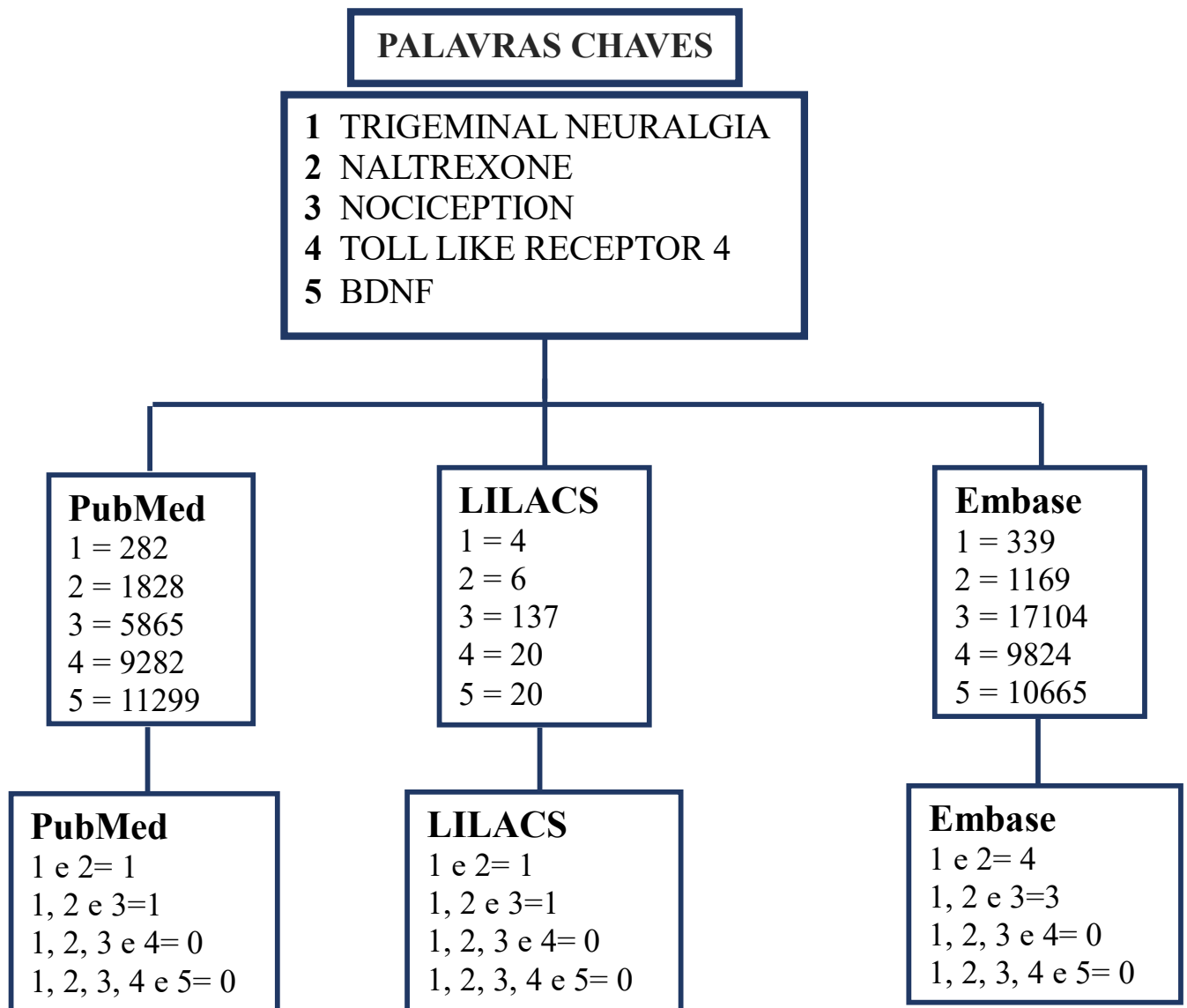


Figura 1. Fluxograma das pesquisas realizadas nas principais bases de dados.

## 2.2 DOR NEUROPÁTICA

Dor neuropática é definida pela Associação Internacional para Estudo da Dor (IASP) como a dor decorrente de uma lesão ou doença que afeta o sistema somatossensorial (Truini et al. 2013). Esta pode ser dividida em central ou periférica, sendo a dor neuropática central oriunda de lesões ou doenças que acometem o sistema nervoso central, tais como esclerose múltipla, lesão na medula espinhal, acidente vascular encefálico, entre outros (Attal et al. 2011). As dores neuropáticas periféricas são as mais comuns, normalmente provocadas por traumas de causas diversas, como lacerações por objetos cortantes, acidentes com armas de fogo ou cirurgias. Podem também ser desencadeadas por patologias como infecções virais (HIV ou Herpes Zoster), tumores, quimioterápicos ou doenças sistêmicas (Bouhassira et al. 2008).

A prevalência da dor neuropática é contraditória, pois não há instrumentos específicos para sua avaliação, mas estima-se uma prevalência de 7-8% em populações com dor crônica apresentem características neuropáticas (Attal et al. 2011).

Alodinia é o sintoma mais característico da dor neuropática, onde estímulos inócuos são percebidos como dolorosos, seguida por hiperalgesia representada por uma resposta nociceptiva exacerbada a estímulos dolorosos, tanto mecânicos quanto térmicos. Outros possíveis sintomas presentes nestes pacientes são hipoestesia, perda ou diminuição da sensibilidade e parestesia, sensações cutâneas subjetivas (Woolf and Decosterd 2000).

A dor neuropática pode ser entendida como uma geração ectópica de impulsos nervosos envolvendo fibras de pequeno calibre do tipo C e A $\delta$  (Bostock et al. 2005). Após lesão nervosa, alguns pacientes desenvolvem alteração na distribuição e conformação de canais iônicos (especialmente canais de sódio) promovendo um aumento da excitabilidade axonal das fibras finas nociceptiva (Sessle et al. 2010). Tal excitabilidade é, muitas vezes, gerada longe do foco da lesão inicial (por isso chamadas de descargas ectópicas), mas capaz de acarretar o surgimento de sintomas característicos da dor neuropática. Logo, entre os tratamentos mais eficazes para a dor neuropática está o uso dos anticonvulsivantes que atuam em canais de sódio, como a carbamazepina, gabapentina e lamotrigina (Sessle et al. 2010).

A lesão nervosa ocasiona ativação e alterações em células gliais, além da ativação de células do sistema imune, especialmente macrófagos e células T. Ativação destas células é mais extensa na neuropatia do que em processos inflamatórios (Woolf 2010).

Quando as células gliais são ativadas, há produção e liberação de fatores tróficos, neurotransmissores, citocinas e espécies reativas de oxigênio, importantes mediadores na sensibilização central (Woolf 2010). A liberação de citocinas pró-inflamatórias, como interleucina 1- $\beta$  (IL1- $\beta$ ) e TNF- $\alpha$  por astrócitos e micróglia, acarreta aumento da transmissão glutamatérgica e redução na inibição pelos interneurônios do corno dorsal da medula espinal gerando a sensibilização por dor neuropática (Silva et al. 2015).

### 2.3 NEURALGIA DO TRIGÊMEO

A NT foi definida pela IASP como "episódios súbitos, geralmente unilaterais, graves, breves e recorrentes e recorrentes de dor na distribuição de um ou mais ramos do nervo trigêmeo" (Bogduk 1994). Caracterizando-se por uma dor breve, unilateral, recorrente, semelhante a um choque elétrico (Olesen and Steiner 2004).

O nervo trigêmeo corresponde ao V par craniano, é um nervo misto, com predomínio da porção sensitiva, sendo responsável pela inervação da face e da cavidade oral e subdividido em três ramos: oftálmico, maxilar e mandibular (Leclercq et al. 2013). A NT acomete com mais frequência o ramo maxilar e/ou ramo mandibular do nervo trigêmeo, sendo o lado direito mais acometido em relação ao lado esquerdo (Maarbjerg et al. 2014). A NT ainda é subdividida em NT clássica ou NT secundária, podendo ser causada por esclerose múltipla ou por lesão ocupante do espaço, como um tumor ou aneurisma cerebral, por exemplo (Maarbjerg et al. 2017).

A NT clássica é a mais comum e caracteriza-se por uma dor de alta intensidade, podendo atingir intensidade 10 na escala visual analógica de dor (0-10) (Edlich et al. 2006). A dor se apresenta de forma paroxística, ou seja, dor de alta intensidade, que surge de forma abrupta, inesperada e com curta duração, que podem acontecer várias vezes ao dia, descrita como choque elétrico (Maarbjerg et al. 2017). Pode ser desencadeada por diversos fatores inócuos, como toque na região inervada pelo nervo trigêmeo, mastigação, escovação dentária ou até mesmo o vento em contato com o rosto (Maarbjerg et al. 2014). Outra característica comum da NT são períodos de remissão que podem durar meses ou até mesmo anos. Este fenômeno é atribuído a uma redução de excitabilidade e remielinização parcial (Devor et al. 2002).

Estima-se que a incidência da NT seja de 28,9 casos a cada 100.000 habitantes (Dieleman et al. 2008) e acomete principalmente mulheres com idades entre 60 a 70 anos

(Cruccu et al. 2006). O diagnóstico de NT baseia-se principalmente na queixa do paciente, pois não há exames laboratoriais ou de imagem para um diagnóstico definitivo. Ao analisar a história clínica do paciente devem ser observados fatores que podem levar a um diagnóstico errôneo, como dor de origem dentária (Ibrahim 2014).

A fisiopatologia da NT não está totalmente elucidada, mas acredita-se que a NT clássica ocorra por um processo de desmielinização ou compressão neurovascular (Leclercq et al. 2013). A compressão vascular é responsável por até 90% dos casos de NT (McLaughlin et al. 1999). Por outro lado, a NT secundária decorre de alguma patologia ou trauma, sendo qualquer doença ou lesão da via trigeminal.

Os episódios dolorosos são longos, com duração de até 4 horas, uma dor de fundo, contínua, pode persistir entre os episódios. A dor intensifica-se no período da noite, sendo descrita como em queimação, superficial, em agulhadas, provocada por estímulos (nocivos ou não) na região afetada. Podem ser afetados os três dermatômos não havendo existência de pontos gatilho e período refratário (Bogduk 1994).

#### 2.4 TRATAMENTOS DISPONÍVEIS PARA NEURALGIA DO TRIGÊMEO

Atualmente, não existe cura para NT (Allsop et al. 2015). O tratamento baseia-se em fármacos para alívio da dor. Carbamazepina, utilizada para tratar a NT desde 1962 (Blom 1962), é um anticonvulsivante que bloqueia canais de sódio, diminuindo a excitabilidade e atenuando seletivamente as descargas ectópicas associadas à dor na NT. Este fármaco atua reduzindo os paroxismos e as crises desencadeadas pela ativação de pontos de gatilho, proporcionando alívio da dor em 58% a 100% dos doentes (Cruccu et al. 2008). Apesar de proporcionar alívio da dor em poucos dias, apresenta importantes efeitos colaterais, como leucopenia, efeitos antimuscarínicos, disfunção hepática, cansaço, sonolência e náuseas. A dose varia entre 100 mg a 2.400 mg ao dia, seu uso deve ser iniciado com doses baixas, e aumentando gradativamente para minimizar os efeitos adversos (Krafft 2008).

A oxcarbamazepina é um pró-fármaco, e surgiu como um substituto da carbamazepina, com eficácia semelhante e efeitos adversos reduzidos, principalmente os antimuscarínicos pois não utiliza o sistema citocromo hepático, tornando-o mais tolerável e com menos interações que carbamazepina (Gronseth et al. 2008). Outros fármacos utilizados na tratamento da NT são baclofeno e lamotriguina, que também apresentam



efeitos adversos indesejados, como fraqueza e ataxia (Zakrzewska and McMillan 2011). Cabe ressaltar que até 30% dos pacientes não respondem ao tratamento medicamentoso ou não toleram seus efeitos colaterais (Finnerup et al. 2005; Edlich et al. 2006; Attal et al. 2006). A utilização de fenitoína, gabapentina, pregabalina e valproato também já foi descrita como benéfica para NT (Cruccu et al. 2008).

Existe a possibilidade de uma abordagem cirúrgica, mas apresenta maior taxa de sucesso quando realizada precocemente. Entre as técnicas mais utilizadas estão a termocoagulação do gânglio de gasser e a descompressão neurovascular. Na termocoagulação do gânglio de Gasser, o gânglio é lesionado por calor, injeção de glicerol ou compressão mecânica por balão, sendo realizada sob intensa sedação ou anestesia geral. Pode promover alívio sintomático por até doze anos, podendo ser repetida duas ou três vezes ao longo da vida. Entretanto, tem como aspecto negativo o risco de dor por desaferentação, tão debilitante quanto NT (Leclercq et al. 2013; Zakrzewska and McMillan 2011).

A descompressão neurovascular, por sua vez, preserva a função trigeminal, mas é um procedimento neurocirúrgico maior com risco de mortalidade, variando de 0,2 a 0,5%. Craniotomia na região pós-auricular é necessária para que a compressão do nervo seja eliminada. Complicações pós-operatórias incluem vazamentos de líquido, hematomas, meningites assépticas, diplopia e fraqueza facial. A principal complicação a longo prazo é perda auditiva ipsilateral, que pode ser maior que 10% (Zakrzewska and McMillan 2011).

## 2.5 NALTREXONA

Naltrexona é um antagonista competitivo dos receptores opioides, tendo seu uso aprovado pelo *Food and Drugs Administration* (FDA) em 1984 para o tratamento da dependência a opioides e ao álcool. Este fármaco apresenta grande absorção por via oral, e é amplamente afetado pelo metabolismo de primeira passagem, onde é metabolizado por uma enzima não- citocromo desidrogenase em seu metabólito ativo 6-beta-naltrexol. Sua excreção ocorre principalmente por via renal, e não existem ajustes posológicos descritos pelo fabricante (Patten et al. 2018).

A dose usual varia de 50 a 150 mg, onde atua prevenindo a inibição do receptor do ácido gama-aminobutírico (GABA), além de inibir a liberação de dopamina. O uso de

baixas doses de naltrexona, com doses variando entre 1,5mg a 3 mg, foi utilizado pela primeira vez na década de 90, em pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida, onde observou-se um efeito imunomodulador (Patten et al. 2018; Toljan and Vrooman 2018).

O mecanismo de ação de doses baixas de naltrexona está relacionado a modulação glial com efeito neuroprotetor, por inibição da ativação da micróglia no SNC, este efeito é observado somente em doses que variam de 1 mg até 5mg. Micróglia são células imunes residentes do SNC que, quando ativadas, liberam fatores pró-inflamatórios, incluindo citocinas, radicais livres, óxido nítrico e eicosanóides, desencadeando a cascata pró-inflamatória. Este de inflamação central com uma consequente gama de sintomas e desfechos clínicos, incluindo maior sensibilidade à dor, fadiga, transtornos cognitivos e humor, bem como alterações de sono. Naltrexona atua como antagonista no receptor *Toll-like 4* (TLR4), presente na micróglia (Younger et al. 2014; Toljan and Vrooman 2018), inibindo a produção das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- $\alpha$ , bem como o fator inflamatório óxido nítrico (NO). Importantes mediadores inflamatórios que contribuem para a sensibilização dolorosa via processamento de sinais nociceptivos, resultando em efeito analgésico e anti-inflamatório (Li et al. 2018; Toljan and Vrooman 2018).

Doses usuais de naltrexona induzem bloqueio permanente do receptor opioide, por outro lado baixas doses de naltrexona induzem bloqueio transitório do receptor opioide, aumentando a síntese e liberação de opioides. Tanto naltrexona, quanto o seu metabólito ativo, 6-b-naltrexol, são antagonistas competitivos reversíveis dos receptores  $\mu$ -opioides e  $\kappa$ -opioides, com afinidade maior pelos receptores  $\mu$ -opioides (Patten et al. 2018). Estudos demonstram que a administração de naltrexona em baixas doses resulta em um bloqueio dos receptores por 4 a 6 horas, induzindo aumento na produção endógenas de opioides. Além disso, há também um aumento na densidade de receptores opioides do tipo  $\mu$ , fenômeno denominado *up-regulation*, que proporciona aumento nos níveis de endorfinas e encefalinas (Patten et al.2018).

Devido a este mecanismo de ação, a naltrexona em baixas doses tem sido utilizada *off-label* para o tratamento da dor e inflamação em diversas doenças crônicas, como fibromialgia, doença de Crohn e esclerose múltipla (Patten et al. 2018).

A fibromialgia é uma condição crônica relacionada a dor musculoesquelética generalizada, alterações cognitivas, de sono e fadiga. Sabe-se que a fisiopatologia da fibromialgia envolve sensibilização central, logo a naltrexona surge como uma alternativa para o tratamento deste pacientes (Parkitny and Younger 2017). Um estudo avaliou os

níveis séricos de citocinas em mulheres com fibromialgia durante 10 semanas. Após 8 semanas de com baixas doses de naltrexona, observou-se uma redução das citocinas pró inflamatórias. Além disso, as pacientes relataram diminuição da dor e dos sintomas relacionados a fibromialgia (Parkitny and Younger 2017). Younger em 2009 observou uma diminuição de 30% nos sintomas da fibromialgia, em pacientes que utilizaram baixas doses de naltrexona, em comparação ao grupo que recebeu placebo. Além disso, as pacientes apresentaram melhora nos limiares de dor mecânica e ao calor (Jarred Younger 2009).

Um estudo experimental avaliou os efeitos benéficos do tratamento com baixas doses de naltrexona em um modelo animal de doença de Crohn, uma doença inflamatória clássica. Os ratos foram tratados durante 10 dias e, ao final do tratamento, foi observado uma melhora em relação ao grupo não tratado. (Tawfik et al. 2016a)

Smith et al, 2011, por meio de um ensaio clínico randomizado avaliou a eficácia clínica das baixas doses de naltrexona em pacientes que apresentavam doença de Crohn. Demonstrou uma diminuição de 88% na gravidade dos sintomas da doença de Crohn no grupo que recebeu baixas doses de naltrexona, enquanto no grupo placebo a diminuição foi de 40% (Smith et al. 2011).

Gironi et al, 2008, avaliou, por meio de um estudo piloto, a segurança e a tolerabilidade das baixas doses de naltrexona em pacientes com esclerose múltipla. 40 pacientes foram avaliados durante 6 meses, o fármaco foi bem tolerado, além de promover uma diminuição na espasticidade destes pacientes (Gironi et al. 2008). Cree et al, 2010, mostrou que pacientes que receberam baixas doses de naltrexona obtiveram uma melhora na qualidade de vida (Cree et al. 2010).

Portanto, a utilização de baixas doses de naltrexona se mostrou segura e bem tolerada pelos pacientes, surgindo como opção para o tratamento de doenças crônicas. No entanto, mais estudos são necessários para comprovar sua eficácia.

## 2.6 BIOMARCADORES

O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) é uma neurotrofina que está amplamente distribuído no sistema nervoso central, reconhecida como importante marcador de plasticidade neuronal relacionada a receptores N-metil D-Aspartato (NMDA) em vias nociceptivas ascendente e descendentes (Brietzke et al. 2016). Seu

efeito neuroplástico está associado ao equilíbrio das sinapses excitatórias e inibitórias (Binder and Scharfman 2004). Além disso, os níveis de BDNF estão associados à sensibilidade à dor, e apresentam um papel pro nociceptivo bem documentado nos processos de dor inflamatória e neuropática (Zhang et al. 2013).

Entre as citocinas, a interleucina-10 (IL-10) é uma citocina anti-inflamatória liberada em um estágio tardio do processo inflamatório. Tem uma função protetora, prevenindo o dano tecidual excessivo causado pela inflamação (Ouyang et al. 2011; Tabas 2013), e está relacionado à dor neuropática (Khan et al. 2015). Por outro lado, o TNF- $\alpha$  é uma citocina relacionada à patogênese da dor neuropática periférica e central (Leung and Cahill 2010), particularmente associado a dor e capaz de ativar outras citocinas (Choi et al. 2015; Leung and Cahill 2010).

---

**JUSTIFICATIVA**

### 3 JUSTIFICATIVA

Dor crônica é uma doença debilitante com consequências nefastas para condições físicas, psicológicas e comportamentais. Além do desconforto causado pela dor, transtornos como depressão, ansiedade e deficiências psicomotoras relacionados a quadros de dor crônica levam ao prejuízo social e econômico do paciente.

A neuralgia trigeminal reduz significativamente a qualidade de vida do paciente, sendo considerada a mais agonizante das dores orofaciais. O tratamento farmacológico é a primeira escolha, e baseia-se no uso de analgésicos clássicos ou fármacos adjuvantes e estabilizadores de membrana, como os anticonvulsivantes. Apesar dos anticonvulsivantes compreenderem grupo farmacológico com melhor resposta no tratamento das neuralgias, a resposta quanto a remissão dos sintomas é ainda insuficiente. Além disto, estão relacionados a importantes efeitos adversos. Entretanto, nem todos pacientes sentem alívio significativo dos sintomas e cerca de 30% não toleram os efeitos colaterais. Em casos de refratariedade ao tratamento farmacológico há indicação de cirurgia, no entanto seus resultados não são permanentes e nem todos os pacientes podem ser submetidos a procedimentos cirúrgicos. Com base nessas informações, faz-se necessária a busca por novas terapias no âmbito da terapêutica da neuralgia trigeminal.

Sendo assim, esta dissertação buscou elucidar o mecanismo de ação das baixas doses de naltrexona, em um modelo de neuralgia trigeminal em ratos, por meio da avaliação dos níveis centrais de citocinas, BDNF e receptor do tipo Toll Like 4.

---

**HIPÓTESE**

#### **4 HIPÓTESE**

Naltrexona em baixas doses é capaz de reduzir a resposta hiperalgésica mecânica em ratos submetidos a um modelo de dor neuropática orofacial (neuralgia trigeminal). E esta redução envolve alterações nos níveis de citocinas (TNF- $\alpha$  e IL-10), fator neurotrófico (BDNF) e receptor do tipo Toll Like 4 (TLR 4) em tronco encefálico e medula espinhal.



---

## **OBJETIVOS**

## 5 OBJETIVOS

### 5.1 OBJETIVO GERAL

Essa dissertação teve como objetivo geral avaliar o efeito do tratamento com baixas doses de naltrexona em modelo de dor neuropática trigeminal em ratos.

### 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Caracterizar o fio de sutura mais apropriado para obtenção de modelo cirúrgico de dor neuropática trigeminal em ratos;
- ✓ Mensurar a resposta nociceptiva (hiperalgesia mecânica), por meio do teste de Von Frey eletrônico, de ratos submetidos a um modelo cirúrgico de dor neuropática trigeminal;
- ✓ Verificar se os efeitos de baixas doses de naltrexona estão relacionados aos processos de neuroplasticidade, avaliando níveis de BDNF em tronco encefálico e medula espinhal destes ratos;
- ✓ Avaliar as respostas de sensibilização central por meio da mensuração de citocinas pró e anti-inflamatórias (IL-10 e TNF-  $\alpha$ ) assim como o *Toll Like Receptor 4* (TLR4) em tronco encefálico e medula espinhal destes ratos.

# **PARTE II**

---

**ARTIGOS CIENTÍFICOS**

## **6.1 ARTIGO 1**

### **“MODELO DE DOR NEUROPÁTICA TRIGEMINAL EM RATOS”**

Será submetido ao periódico: Saúde e Desenvolvimento Humano

## ARTIGO ORIGINAL

### MODELO DE DOR NEUROPÁTICA TRIGEMINAL EM RATOS

Camila Lino de Oliveira<sup>1,2,3\*</sup>, Liciane Fernandes Medeiros<sup>2,3,4</sup>, Vanessa Silva de Souza<sup>1,2,3</sup>, Bettega Costa Lopes<sup>2,3</sup>, Fabricio Finamor<sup>2,3</sup>, Luana Xavier Marques<sup>2,3</sup>, Iraci L. S. Torres<sup>1,2,3</sup>, Andressa de Souza<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 90050- 170, Brasil.

<sup>2</sup>Laboratório de Farmacologia da Dor e Neuromodulação: Investigações Pré Clínicas – Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 90050-170, Brazil.

<sup>3</sup>Unidade de Experimentação Animal e Grupo de Pesquisa e Pós Graduação, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS 90035-007, Brazil.

<sup>4</sup>Programa de Pós Graduação em Saúde e Desenvolvimento Humano, Centro Universitário Unilasalle, Canoas, RS 92010-000, Brazil.

\*Autor correspondente

Camila Lino de Oliveira

Autor Correspondente:

Instituto de Ciências Básicas da Saúde – ICBS

Universidade Federal do Rio Grande do Sul,

Rua Sarmiento Leite, 500/305 Porto Alegre, RS Brazil, 90050170

E-mail: c.linooliveira@gmail.com

## RESUMO

Neuralgia do trigêmeo (NT) é um quadro de dor neuropática orofacial caracterizada por dor paroxística semelhante a um choque elétrico, localizada nas divisões de um ou mais ramos do nervo trigêmeo. A criação de um modelo animal confiável que se assemelhe à NT clínica é crucial para pesquisas experimentais. O método mais clássico é a lesão por constrição crônica do nervo infraorbital, que consiste na amarração de duas ligaduras com fio de sutura ao redor do nervo infra orbitário, resultando na redução do limiar nociceptivo. Entretanto, até o presente momento, parece não haver um consenso sobre o fio mais adequado para este tipo de modelo animal de NT. Diante disso, o objetivo deste estudo foi caracterizar o fio de sutura mais apropriado para obtenção de modelo de dor crônica neuropática orofacial em ratos, avaliando a resposta hiperalgésica mecânica de ratos submetidos a um modelo cirúrgico de neuralgia trigeminal. Quinze ratos wistar macho adultos foram randomizados por peso em três grupos experimentais: Grupo *Sham* dor, Dor + fio Seda e Dor + fio Nylon. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (GPPG-HCPA protocolo número 2017-0575). Para avaliação do limiar de hiperalgesia mecânica foi utilizado o teste de Von Frey facial, que foi realizado início do estudo, 7º, 14º, 15º e 24º dia após a cirurgia. Nossos achados demonstraram que o limiar de hiperalgesia mecânica facial foi semelhante entre os grupos no início do estudo, e no 7º dia após a cirurgia. (GEE,  $P > 0,05$ ), Entretanto, no 14º dia, foi possível observar que os grupos Dor + fio Seda e Dor + fio Nylon apresentaram menor limiar de hiperalgesia mecânica facial em relação ao grupo *Sham* dor (GEE,  $P < 0,05$ ); e se manteve significativamente menor até o 24º dia do estudo, quando comparado com o grupo *Sham* dor (GEE,  $P < 0,05$ ). Contudo, não foram observadas diferença significativa entre os fio utilizados na amarradura do nervo. Sendo assim, nossos achados demonstram que a utilização dos fios de sutura seda 4-0 e nylon 4-0, para indução de NT em ratos, se mostra adequada, possibilitando a avaliação de efeitos de terapias farmacológicas e não farmacológicas em longo prazo.

Palavras-chave: Neuralgia do trigêmeo, dor, ratos.

## **INTRODUÇÃO**

Neuralgia do trigêmeo (NT) é um quadro de dor neuropática caracterizada por dor paroxística semelhante a um choque elétrico, localizada nas divisões de um ou mais ramos do nervo trigêmeo (Lee et al. 2016; Zhong et al. 2012). A fisiopatologia da NT ainda não está totalmente elucidada, logo, a criação de um modelo animal confiável que se assemelhe à NT clínica é crucial para pesquisas experimentais. O método mais clássico é a lesão por constrição crônica do nervo infraorbital. A cirurgia consiste na amarração de duas ligaduras com fio de sutura ao redor do nervo infra orbitário, resultando na redução do limiar nociceptivo (Luiz et al. 2015; Nakai et al. 2014; Li et al. 2014; Li et al. 2014).

No entanto, até o presente momento, não há um consenso sobre o fio mais adequado para este tipo de modelo animal de NT. Alguns estudos descrevem a utilização do fio seda como sendo eficaz para o modelo (Zhang et al. 2017; M'Dahoma et al. 2018; Michot et al. 2017; Uddin et al. 2018), por outro lado, o fio nylon também tem sido utilizado com frequência (Savernini et al. 2012; Moon et al. 2017). O fio Vycril tem demonstrado sucesso na constrição crônica do nervo ciático (Filho et al. 2016; Spezia Adachi et al. 2018; Cioato et al. 2016), no entanto, quando utilizado no modelo de NT, em uma avaliação mais longa, não foi efetivo (Callai et al. 2019).

Diante disso, o objetivo deste estudo foi caracterizar o fio de sutura mais apropriado para obtenção de modelo de dor neuropática trigeminal em ratos, avaliando o limiar de dor dos animais em diferentes períodos após a cirurgia de constrição crônica do nervo infra-orbitário.

## **METODOLOGIA**

### **Animais**

Um total de 15 ratos Wistar machos adultos (60 dias de idade, 200 a 250g no início do tratamento), fornecidos pelo Centro de Reprodução e Experimentação Animal (CREAL) do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), randomizados por peso corporal e alojados em grupos de 2 a 3 ratos por gaiola de polipropileno (49 × 34 × 16 cm). Todos os animais foram mantidos em um ciclo padrão de luz / escuridão de 12 horas (luzes acesas às 7h00 e luzes apagadas



às 19h00), em um ambiente com temperatura controlada ( $22 \pm 2$  ° C) e tinham acesso livre à água e ração Nuvital®.

Todos os experimentos e procedimentos foram aprovados pelo Comitê Institucional de Cuidado e Uso de Animais (protocolo GPPG-HCPA nº 20170575) e estavam em conformidade com as diretrizes brasileiras envolvendo o uso de animais em pesquisa (Lei 11.794).

### Desenho experimental

Os ratos foram randomizados por peso, e divididos em 3 grupos experimentais: *Sham* dor, Dor + Seda e Dor + Nylon, para determinar qual o fio de sutura mais apropriado para obtenção de modelo de dor crônica neuropática orofacial em ratos. O limiar de hiperalgesia mecânica facial foi avaliado pelo teste de von Frey eletrônico antes da cirurgia e aos 7, 14, 15 e 24 dias após a cirurgia. Os ratos foram eutanasiados após o teste comportamental, 24 dias após a cirurgia, conforme Figura 1.



Figura 1: Desenho experimental

### Modelo de neuralgia trigeminal

O modelo de dor utilizado foi o de constrição crônica do nervo infraorbitário adaptado do proposto por Imamura et al. 1997. Sendo o nervo infraorbitário um ramo do trigêmeo, este modelo simula a neuralgia trigeminal secundária. Inicialmente, os ratos foram anestesiados com cetamina (50mg/kg, i.p.) + xilasina (5mg/kg, i.p.) para indução e isoflurano (2% inalatório) para manutenção. Acesso cirúrgico foi por uma incisão intraoral na altura do primeiro molar superior direito que se estenderá ao longo do fundo de sulco por cerca de 1cm no sentido anterior. Os tecidos foram dissecados e o nervo infraorbitário, exposto. Foram realizadas duas ligaduras com fio Seda 4-0 ou fio Nylon

4-0 (de acordo com o grupo experimental), no nervo infraorbitário, mantendo 2mm de distância entre cada uma. Após a realização das ligaduras, a incisão foi suturada com fio Seda 4-0. Os animais foram mantidos em incubadora aquecida até a recuperação da anestesia. Os animais do grupo *Sham* dor foram submetidos ao mesmo procedimento de anestesia, acesso cirúrgico e sutura, porém sem a constrição do feixe nervoso. O acesso intrabucal foi realizado para que vibrissas do animal permanecessem intactas e por promover uma agressão menos lesiva ao animal quando comparado com o acesso pelo crânio. Após a cirurgia, foi administrado cloridrato de tramadol (20mg/kg, i.p.) em intervalos de 12 horas nas primeiras 72 horas para alívio da dor, minimizando o desconforto dos animais (Figura 2).



Figura 2: Exposição do nervo infra-orbitário.

### **Teste von Frey**

Este teste avalia a sensibilidade hiperalgésica mecânica e consiste na aplicação de pressão de um bastão metálico com uma ponta plástica sobre a área a ser testada, no caso, vibrissas. A pressão gerada é marcada no visor do aparelho mostrando assim o limiar de sensibilidade mecânica do animal. Esta é feita até que o rato faça um movimento aversivo de retirada ou tentativa de morder a ponteira (Fruhstorfer et al. 2001). Esta medida é mensurada em gramas (g), por meio da média de três mensurações com intervalos entre 3 min cada. As medidas foram avaliadas antes da cirurgia, e foram repetidas no 7º, 14º, 15º e 24º dia pós-operatório.

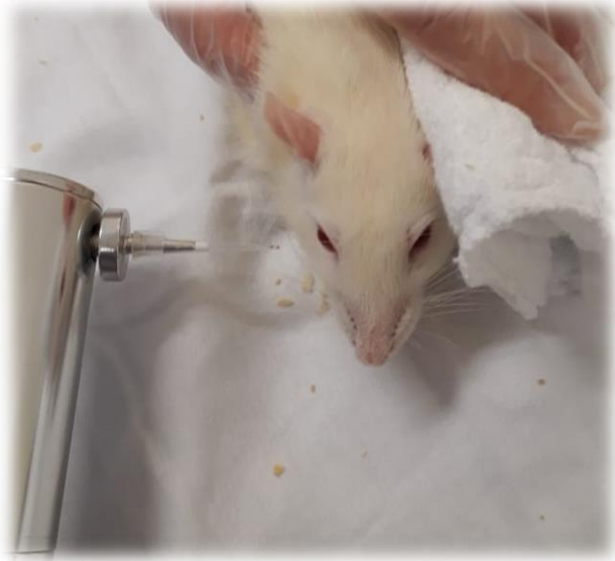


Figura 3: Avaliação do limiar de hiperalgesia facial através do teste de von Frey.

### **Análises estatísticas**

Os dados foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). A equação de estimativa generalizada (GEE) foi realizada para analisar o comportamento nociceptivo. As diferenças foram consideradas significantes quando  $P < 0,05$ . O IBM SPSS Statistics versão 20, Armonk, NY, EUA para Windows foi utilizado para as análises estatísticas.

## **RESULTADOS**

O modelo utilizado para indução da NT foi eficaz em reduzir o limiar de dor dos ratos avaliados pelo teste de Von Frey facial, nos grupos Dor + Seda e Dor + Nylon. No décimo quarto dia após a cirurgia para indução da neuralgia trigeminal, os ratos submetidos à constrição do nervo infra-orbitário, independente do fio de sutura utilizado, apresentaram o limiar de retirada da face significativamente menor que os ratos do grupo *Sham* dor. O limiar se manteve significativamente menor até o 24º dia do estudo, quando comparado com o grupo *Sham* dor (Figura 1). A análise estatística (GEE) mostrou interação entre as variáveis independentes, tempo x grupo Wald  $\chi^2 = 27,762; 8; P < 0,001$ .

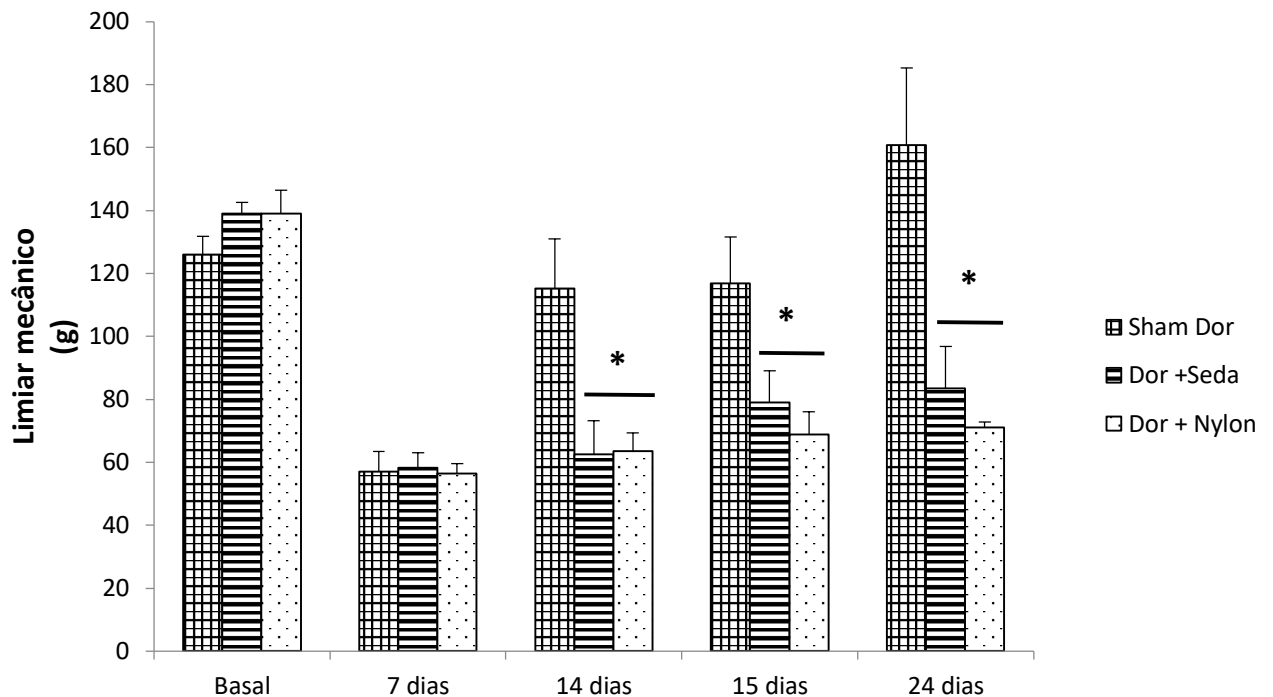


Figura 1: Limiar de hiperalgesia mecânica facial avaliada no teste de Von Frey. Dados expressos em Média+EPM (N=15). Grupo *Sham* dor, Dor + Seda e Dor + Nylon. \*Diferença significativa dos grupos Dor + Seda e Dor + Nylon em relação ao grupo *Sham* dor. GEE (Wald  $\chi^2= 27,762;8; P<0,001$ ).

## DISCUSSÃO

Considerando dados diversos da literatura sobre a duração do modelo de dor neuropática por constrição crônica do nervo infra-orbitário, neste presente artigo, investigou-se a caracterização de dois fios de sutura no desenvolvimento e manutenção da neuralgia trigeminal em ratos. A partir de resultados prévios do grupo, identificou-se que a utilização do fio Vycril funciona perfeitamente para indução de modelo de dor trigeminal em ratos, no entanto a manutenção desta NT perdura por um período relativamente curto o que não permite a investigação de efeitos de tratamentos crônicos para analgesia ou redução da hiperalgesia facial apresentada pelos animais (Callai et al. 2019). Para tanto, a proposta do presente estudo foi avaliar a manutenção da dor neuropática trigeminal por meio de dois fios de sutura diferentes, fios nylon e seda, e para

um segundo protocolo, avaliar a analgesia induzida por tratamentos farmacológicos repetidos, sem que ocorra a perda do modelo de dor.

Os resultados do presente estudo, é notório que ao realizar o modelo de NT torna-se indispensável à utilização de um fio de sutura adequado. Essa observação se faz necessária principalmente quando se objetiva o teste de terapias prolongadas. Para mensurar resposta hiperalgésica facial destes animais, utilizou-se o teste de von Frey eletrônico, onde se obtém o limiar hiperalgésico mecânico facial.

Importante ressaltar que 7 dias após a indução da NT, todos os grupos apresentaram redução no limiar mecânico facial, inclusive o *Sham Dor*, caracterizando assim o processo de dor inflamatória no local de realização do procedimento cirúrgico. No entanto, nota-se que o estabelecimento da dor neuropática orofacial ocorre 14 dias após a cirurgia, e se mantém durante 24 dias após a constrição crônica do nervo infra-orbitário, uma vez que apenas os grupos Dor apresentam redução do limiar mecânico facial em relação ao grupo *Sham Dor*. Esse resultado está de acordo com outros achados do nosso grupo, onde se estabeleceu um modelo de dor neuropática por constrição crônica do nervo isquiático (Filho et al. 2016; Spezia Adachi et al. 2018; Cioato et al. 2016), mesmo sendo um local anatomicamente diferente, o padrão temporal de indução de neuropatia apresentou similaridade.

Em relação aos achados do nosso estudo quanto a caracterização do fio de sutura mais adequado para a indução e manutenção do modelo de NT, nossos resultados corroboram com a literatura. Utilizando fio seda para estabelecer o modelo de NT em ratos Sprague–Dawley, M'Dahoma et al. 2018 (M'Dahoma et al. 2018), observaram a ocorrência de alodinia mecânica na área inervada pelo nervo infraorbitário quando realizada no período de 14 dias pós-cirurgia, por meio do teste de Von Frey filamentos. Demonstrando assim, que o fio seda pode ser utilizado com confiança em avaliações agudas.

Este mesmo fio foi utilizado por Zhang et al. 2017 (Zhang et al. 2017), e a hiperalgesia facial dos ratos foi avaliada durante 7 semanas por meio do teste de von Frey filamentos. O grupo Dor apresentou um limiar de dor significativamente reduzido em relação ao grupo *Sham dor*, que se manteve durante as 7 semanas de avaliação. Sendo assim, a utilização do fio seda é indicado para avaliações de efeitos analgésicos de terapias prolongadas.

Por outro lado, a utilização do fio nylon 4-0 para realização da ligadura no nervo infraorbitário, conforme realizado por Savernini et al. 2012 (Savernini et al. 2012),

também apresenta considerável indução e manutenção do modelo de NT em ratos. O limiar térmico dos ratos que receberam ligadura do nervo com fio nylon, foi menor quando comparado ao grupo *Sham Dor*, até o 24º dia pós-cirurgia. Esses resultados caracterizam que o fio nylon é também uma opção para indução de modelo de NT em ratos.

Em suma, o presente artigo destaca a utilização de diferentes fios de sutura, como seda 4-0 e nylon 4-0, para indução de NT em ratos, e principalmente, para manutenção da NT e conseqüentemente avaliação de efeitos de terapias farmacológicas e não farmacológicas em longo prazo.

### **AGRADECIMENTOS**

Este trabalho foi apoiado pelas seguintes agências financiadoras brasileiras: Agência Federal Brasileira de Apoio e Avaliação de Pós-Graduação - CAPES (Camila Lino de Oliveira), o Grupo de Pesquisa de Pós-Graduação (GPPG) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre - HCPA (número de concessão 2017- 0575).

### **REFERÊNCIAS**

- Allsop, Matthew J., Maureen Twiddy, Hilary Grant, Carolyn Czoski-Murray, Mark Mon-Williams, Faisal Mushtaq, Nick Phillips, Joanna M. Zakrzewska, and Sue Pavitt. 2015. "Diagnosis, Medication, and Surgical Management for Patients with Trigeminal Neuralgia: A Qualitative Study." *Acta Neurochirurgica* 157 (11): 1925–33. <https://doi.org/10.1007/s00701-015-2515-4>.
- Attal, N., G. Cruccu, M. Haanpää, P. Hansson, T. S. Jensen, T. Nurmikko, C. Sampaio, S. Sindrup, and P. Wiffen. 2006. "EFNS Guidelines on Pharmacological Treatment of Neuropathic Pain." *European Journal of Neurology* 13 (11): 1153–69. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2006.01511.x>.
- Attal, Nadine, Michel Lanteri-Minet, Bernard Laurent, Jacques Fermanian, and Didier Bouhassira. 2011. "The Specific Disease Burden of Neuropathic Pain: Results of a French Nationwide Survey." *Pain* 152 (12): 2836–43. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2011.09.014>.
- Baron, Ralf. 2006. "Mechanisms of Disease: Neuropathic Pain - A Clinical Perspective."

- Nature Clinical Practice Neurology* 2 (2): 95–106.  
<https://doi.org/10.1038/ncpneuro0113>.
- Binder, Devin K, and Helen E Scharfman. 2004. “Brain-Derived Neurotrophic Factor.” *Growth Factors (Chur, Switzerland)* 22 (3): 123–31.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2008.05.010>.
- Blom, S. 1962. “Trigeminal Neuralgia: Its Treatment With a New Anticonvulsant Drug (G-32883).” *The Lancet* 279 (7234): 839–40. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(62\)91847-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(62)91847-0).
- Bogduk, Harold Marskey; Nikolai. 1994. “Classification of Chronic Pain- Descriptions of Chronic Pain Syndromes and Definitions of Pain Terms.”
- Bostock, H., M. Campero, J. Serra, and J. L. Ochoa. 2005. “Temperature-Dependent Double Spikes in C-Nociceptors of Neuropathic Pain Patients.” *Brain* 128 (9): 2154–63. <https://doi.org/10.1093/brain/awh552>.
- Bouhassira, Didier, Michel Lantéri-Minet, Nadine Attal, Bernard Laurent, and Chantal Touboul. 2008. “Prevalence of Chronic Pain with Neuropathic Characteristics in the General Population.” *Pain* 136 (3): 380–87.  
<https://doi.org/10.1016/j.pain.2007.08.013>.
- Bradford, Marion. 1976. “A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding.” *Analytical Biochemistry* 72: 248–54. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- Brietzke, Aline P., Joanna R. Rozisky, Jairo A. Dussan-Sarria, Alicia Deitos, Gabriela Laste, Priscila F.T. Hoppe, Suzana Muller, et al. 2016. “Neuroplastic Effects of Transcranial Direct Current Stimulation on Painful Symptoms Reduction in Chronic Hepatitis C: A Phase II Randomized, Double Blind, Sham Controlled Trial.” *Frontiers in Neuroscience* 9 (JAN): 1–9. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00498>.
- Brown, Norman, and Jaak Panksepp. 2009. “Low-Dose Naltrexone for Disease Prevention and Quality of Life.” *Medical Hypotheses* 72 (3): 333–37.  
<https://doi.org/10.1016/j.mehy.2008.06.048>.
- Callai, Etiane Micheli Meyer, Vanessa Leal Scarabelot, Liciane Fernandes Medeiros, Carla de Oliveira, Andressa de Souza, Isabel Cristina Macedo, Stefania Giotti Cioato, et al. 2019. “Transcranial Direct Current Stimulation (TDCS) and Trigeminal Pain: A Preclinical Study.” *Oral Diseases* 25 (3): 888–97.  
<https://doi.org/10.1111/odi.13038>.

- Cheol Moon, Hyeong, Won Ik Heo, Yon Ji Kim, Dae Lee, So Yoon Won, Hong Rae Kim, Seung Man Ha, Youn Joo Lee, and Young Seok Park. 2017. “Optical Inactivation of the Anterior Cingulate Cortex Modulate Descending Pain Pathway in a Rat Model of Trigeminal Neuropathic Pain Created via Chronic Constriction Injury of the Infraorbital Nerve.” *Journal of Pain Research*, 10–2355. <https://doi.org/10.2147/JPR.S138626>.
- Chogtu, Bharti, K L Bairy, D Smitha, Supurna Dhar, and P Himabindu. 2011. “Comparison of the Efficacy of Carbamazepine, Gabapentin and Lamotrigine for Neuropathic Pain in Rats.” *Indian Journal of Pharmacology* 43 (5): 596–98. <https://doi.org/10.4103/0253-7613.84980>.
- Choi, Byung Moon; Lee, Soo Han; An, Sang Mee; Park, Do Yang; Lee, Gwan Woo; Noh, Gyu-Jeong. 2015. “The Time-Course and RNA Pain Induced by L5 Spinal Nerve IL-1 $\beta$  Expression on Neuropathic Interference of TNF- $\alpha$ , IL-6, and Transection in Rats.” *Korean Journal of Anesthesiology* 68 (2): 159–69.
- Cioato, Stefania Giotti, Liciane Fernandes Medeiros, Paulo Ricardo Marques Filho, Rafael Vercelino, Andressa De Souza, Vanessa Leal Scarabelot, Carla De Oliveira, et al. 2016. “Long-Lasting Effect of Transcranial Direct Current Stimulation in the Reversal of Hyperalgesia and Cytokine Alterations Induced by the Neuropathic Pain Model.” *Brain Stimulation* 9 (2): 209–17. <https://doi.org/10.1016/j.brs.2015.12.001>.
- Costa, Grazielle Mara Ferreira, and Camila Megale De Almeida Leite. 2015. “Trigeminal Neuralgia: Peripheral and Central Mechanisms.” *Revista Dor* 16 (4): 297–301. <https://doi.org/10.5935/1806-0013.20150061>.
- Cree, Bruce A.C., Elena Kornyeveva, and Douglas S. Goodin. 2010. “Pilot Trial of Low-Dose Naltrexone and Quality of Life in Multiple Sclerosis.” *Annals of Neurology* 68 (2): 145–50. <https://doi.org/10.1002/ana.22006>.
- Cruccu, G., A. Biasiotta, F. Galeotti, G. D. Iannetti, P. Innocenti, A. Romaniello, and A. Truini. 2006. *Chapter 14 Diagnosis of Trigeminal Neuralgia: A New Appraisal Based on Clinical and Neurophysiological Findings. Supplements to Clinical Neurophysiology*. Vol. 58. Elsevier B.V. [https://doi.org/10.1016/S1567-424X\(09\)70067-4](https://doi.org/10.1016/S1567-424X(09)70067-4).
- Cruccu, G., G. Gronseth, J. Alksne, C. Argoff, M. Brainin, K. Burchiel, T. Nurmikko, and J. M. Zakrzewska. 2008. “AAN-EFNS Guidelines on Trigeminal Neuralgia Management.” *European Journal of Neurology* 15 (10): 1013–28. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2008.02185.x>.



- Devor, Marshall, Ron Amir, and Z. Harry Rappaport. 2002. "Pathophysiology of Trigeminal Neuralgia: The Ignition Hypothesis." *Clinical Journal of Pain* 18 (1): 4–13. <https://doi.org/10.1097/00002508-200201000-00002>.
- Dieleman, Jeanne P., Joost Kerklaan, Frank J P M Huygen, Paul A D Bouma, and Miriam C J M Sturkenboom. 2008. "Incidence Rates and Treatment of Neuropathic Pain Conditions in the General Population." *Pain* 137 (3): 681–88. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2008.03.002>.
- Filho, Paulo Ricardo Marques, Rafael Vercelino, Stefania Giotti Cioato, Liciane Fernandes Medeiros, Carla de Oliveira, Vanessa Leal Scarabelot, Andressa Souza, et al. 2016. "Transcranial Direct Current Stimulation (TDCS) Reverts Behavioral Alterations and Brainstem BDNF Level Increase Induced by Neuropathic Pain Model: Long-Lasting Effect." *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 64: 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2015.06.016>.
- Finnerup, N. B., M. Otto, H. J. McQuay, T. S. Jensen, and S. H. Sindrup. 2005. "Algorithm for Neuropathic Pain Treatment: An Evidence Based Proposal." *Pain* 118 (3): 289–305. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2005.08.013>.
- Fruhstorfer, H., W. Gross, and O. Selbmann. 2001. "Von Frey Hairs: New Materials for a New Design." *European Journal of Pain* 5 (3): 341–42. <https://doi.org/10.1053/eujp.2001.0250>.
- G. Gronseth, G. Cruccu, J. Alksne, C. Argoff, M. Brainin, K. Burchiel, T. Nurmikko, J.M. Zakrzewska. 2008. "Practice Parameter: The Diagnostic Evaluation and Treatment of Trigeminal Neuralgia (an Evidence-Based Review): Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the European Federation of Neurological Societies." *Neurology* 71 (15): 1183–90. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000326598.83183.04>.
- Gironi, M., F. Martinelli-Boneschi, P. Sacerdote, C. Solaro, M. Zaffaroni, R. Cavarretta, L. Moiola, et al. 2008. "A Pilot Trial of Low-Dose Naltrexone in Primary Progressive Multiple Sclerosis." *Multiple Sclerosis* 14 (8): 1076–83. <https://doi.org/10.1177/1352458508095828>.
- Hamann, Scott R., Hammad Malik, Jewell W. Sloan, and Elzbeita P. Wala. 2004. "Interactions of 'Ultra-Low' Doses of Naltrexone and Morphine in Mature and Young Male and Female Rats." *Receptors and Channels* 10 (2): 73–81. <https://doi.org/10.1080/10606820490464334>.
- Hanka, Haber. 1996. "Alcohol Induces Formation of Morphine Precursors in the Striatum

- of Hats” 60 (5).
- Haviv, Y., J. Khan, A. Zini, G. Almozni, Y. Sharav, and R. Benoliel. 2016. “Trigeminal Neuralgia (Part I): Revisiting the Clinical Phenotype.” *Cephalalgia* 36 (8): 730–46. <https://doi.org/10.1177/0333102415611405>.
- Ibrahim, Suzan. 2014. “Trigeminal Neuralgia: Diagnostic Criteria, Clinical Aspects and Treatment Outcomes. A Retrospective Study.” *Gerodontology* 31 (2): 89–94. <https://doi.org/10.1111/ger.12011>.
- Imamura, Yoshiki, Hiroya Kawamoto, and Osamu Nakanishi. 1997. “Characterization of Heat-Hyperalgesia in an Experimental Trigeminal Neuropathy in Rats.” *Experimental Brain Research* 116 (1): 97–103. <https://doi.org/10.1007/PL00005748>.
- Ira Tabas, Christopher K. Glass. 2013. “Anti-Inflammatory Therapy in Chronic Disease: Challenges and Opportunities Ira.” *Science* 11 (6116): 166–72. <https://doi.org/10.1126/science.1230720>. Anti-Inflammatory.
- Jarred Younger, Sean Mackey. 2009. “Fibromyalgia Symptoms Are Reduced by Low-Dose Naltrexone: A Pilot Study.” *Pain Med* 10 (4): 663–72. <https://doi.org/10.1111/j.1526-4637.2009.00613.x>. Fibromyalgia.
- Junad Khan, Khaled Ramadan, Olga Korczeniewska, Muhammad Moin Anwer, Rafael Benoliela, Eli Eliav. 2015. “Interleukin-10 Levels in Rat Models of Nerve Damage and Neuropathic Pain.” *Neuroscience Letters* 592: 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.07.049>.
- Kilkenny, Carol, William J. Browne, Innes C. Cuthill, Michael Emerson, and Douglas G. Altman. 2013. “Improving Bioscience Research Reporting: The Arrive Guidelines for Reporting Animal Research.” *Animals* 4 (1): 35–44. <https://doi.org/10.3390/ani4010035>.
- Kirkpatrick, D. B. 1989. “Familial Trigeminal Neuralgia: Case Report.” *Neurosurgery* 24 (5): 758–61.
- Kleef, Maarten van; Genderen, Wilco E. van; Narouze, Sem; Nurmikko, Turo J; Zundert, Jan van; Geurts, José W; Mekhail, Nagy. 2009. “Trigeminal Neuralgia.” *Pain Practice* 9 (4): 308–11. <https://doi.org/10.1111/j.1533-2500.2009.00288.x>.
- Krafft, Rudolph M. 2008. “Trigeminal Neuralgia.” *Am Fam Physician* 77 (9): 1291–96.
- Leclercq, D., J.-B. Thiebaut, and F. Héran. 2013. “Trigeminal Neuralgia.” *Diagnostic and Interventional Imaging* 94 (10): 993–1001. <https://doi.org/10.1016/j.diii.2013.08.002>.

- Lee, John Y. K., John T. Pierce, Sukhmeet K. Sandhu, Dmitriy Petrov, and Andrew I. Yang. 2016. "Endoscopic versus Microscopic Microvascular Decompression for Trigeminal Neuralgia: Equivalent Pain Outcomes with Possibly Decreased Postoperative Headache after Endoscopic Surgery." *Journal of Neurosurgery* 126 (5): 1676–84. <https://doi.org/10.3171/2016.5.jns1621>.
- Leung, Lawrence, and Catherine M Cahill. 2010. "TNF-Alpha and Neuropathic Pain--a Review." *Journal of Neuroinflammation* 7 (Cci): 27. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-7-27>.
- Li, K. W., D. S. Kim, F. Zaucke, and Z. D. Luo. 2014. "Trigeminal Nerve Injury-Induced Thrombospondin-4 up-Regulation Contributes to Orofacial Neuropathic Pain States in a Rat Model." *European Journal of Pain (United Kingdom)* 18 (4): 489–95. <https://doi.org/10.1002/j.1532-2149.2013.00396.x>.
- Li, Kang Wu, Yanhui Peter Yu, Chunyi Zhou, Doo Sik Kim, Bin Lin, Kelli Sharp, Oswald Steward, and Z. David Luo. 2014. "Calcium Channel A2δ1 Proteins Mediate Trigeminal Neuropathic Pain States Associated with Aberrant Excitatory Synaptogenesis." *Journal of Biological Chemistry* 289 (10): 7025–37. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.548990>.
- Li, Zijian, Yue You, Noreen Griffin, Juan Feng, and Fengping Shan. 2018. "Low-Dose Naltrexone (LDN): A Promising Treatment in Immune-Related Diseases and Cancer Therapy." *International Immunopharmacology* 61 (36): 178–84. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.05.020>.
- Linda R. Watkins, Mark R. Hutchinson, Annemarie Ledebøer, Julie Wieseler-Frank, Erin D. Milligan, and Steven F. Maier. 2007. "Glia as the 'Bad Guys': Implications for Improving Clinical Pain Control and the Clinical Utility of Opioids." *Brain Behav Immun.* 21 (2): 131–46. <https://doi.org/doi:10.1016/j.bbi.2006.10.011>.
- Love, S, and H B Coakham. 2001. "Trigeminal Neuralgia: Pathology and Pathogenesis." *Brain: A Journal of Neurology* 124 (Pt 12): 2347–60. <https://doi.org/10.1093/brain/124.12.2347>.
- Luiz, A. P., S. D. Schroeder, G. A. Rae, J. B. Calixto, and J. G. Chichorro. 2015. "Contribution and Interaction of Kinin Receptors and Dynorphin A in a Model of Trigeminal Neuropathic Pain in Mice." *Neuroscience* 300: 189–200. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.05.015>.
- M'Dahoma, Saïd, Matthieu Poitevin, Eric Dabala, Hugo Payan, Cecilia Gabriel, Elisabeth Mocaër, Sylvie Bourgoïn, and Michel Hamon. 2018. "A 2 - and B 2 -

- Adrenoreceptor-Mediated Efficacy of the Atypical Antidepressant Agomelatine Combined With Gabapentin To Suppress Allodynia in Neuropathic Rats With Ligated Infraorbital or Sciatic Nerve.” *Frontiers in Pharmacology* 9 (JUN): 1–17. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00587>.
- Maarbjerg, Stine, Aydin Gozalov, Jes Olesen, and Lars Bendtsen. 2014. “Trigeminal Neuralgia-a Prospective Systematic Study of Clinical Characteristics in 158 Patients.” *Headache* 54 (10): 1574–82. <https://doi.org/10.1111/head.12441>.
- Maarbjerg, Stine, Giulia Di Stefano, Lars Bendtsen, and Giorgio Cruccu. 2017. “Trigeminal Neuralgia - Diagnosis and Treatment.” *Cephalalgia* 37 (7): 648–57. <https://doi.org/10.1177/0333102416687280>.
- McLaughlin, Mark R., Peter J. Jannetta, Brent L. Clyde, Brian R. Subach, Christopher H. Comey, and Daniel K. Resnick. 1999. “Microvascular Decompression of Cranial Nerves: Lessons Learned after 4400 Operations.” *Journal of Neurosurgery* 90 (1): 1–8. <https://doi.org/10.3171/jns.1999.90.1.0001>.
- Merskey, Harold. Bogduk, Nikolai. 2011. “Classification of Chronic Pain.” *IASP PRESS*, 222.
- Michot, Benoit, Ronald Deumens, and Emmanuel Hermans. 2017. “Immunohistochemical Comparison of Astrocytic MGlur5 Upregulation in Infraorbital Nerve- versus Sciatic Nerve-Ligated Rat.” *Neuroscience Letters* 653: 113–19. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.05.035>.
- Nakai, Kunihiro, Aya Nakae, Ryota Hashimoto, Takashi Mashimo, and Ko Hosokawa. 2014. “Antinociceptive Effects of Mirtazapine, Pregabalin, and Gabapentin After Chronic Constriction Injury of the Infraorbital Nerve in Rats.” *Journal of Oral & Facial Pain and Headache* 28 (1): 61–67. <https://doi.org/10.11607/jop.1105>.
- Olesen, J., and T. J. Steiner. 2004. “The International Classification of Headache Disorders, 2nd Edn (ICDH-II).” *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 75 (6): 808–11. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2003.031286>.
- Ouyang, Wenjun, Sascha Rutz, Natasha K. Crellin, Patricia A. Valdez, and Sarah G. Hymowitz. 2011. “Regulation and Functions of the IL-10 Family of Cytokines in Inflammation and Disease.” *Annual Review of Immunology* 29 (1): 71–109. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-031210-101312>.
- Parkitny, Luke, and Jarred Younger. 2017. “Reduced Pro-Inflammatory Cytokines after Eight Weeks of Low-Dose Naltrexone for Fibromyalgia.” *Biomedicines* 5 (4): 16. <https://doi.org/10.3390/biomedicines5020016>.

- Patten, Denise K., Bob G. Schultz, and Daniel J. Berlau. 2018. "The Safety and Efficacy of Low-Dose Naltrexone in the Management of Chronic Pain and Inflammation in Multiple Sclerosis, Fibromyalgia, Crohn's Disease, and Other Chronic Pain Disorders." *Pharmacotherapy* 38 (3): 382–89. <https://doi.org/10.1002/phar.2086>.
- Pharmacology, Naltrexone. 1975. "And Metabolism : Current Status" 2 (34): 357–63.
- Pineda-Farias, Jorge B., Nadia L. Caram-Salas, Ana B. Salinas-Abarca, Jorge Ocampo, and Vinicio Granados-Soto. 2017. "Ultra-Low Doses of Naltrexone Enhance the Antiallodynic Effect of Pregabalin or Gabapentin in Neuropathic Rats." *Drug Development Research* 78 (8): 371–80. <https://doi.org/10.1002/ddr.21409>.
- Richard F. Edlich, Kathryne L. Winters, L. D. Britt, William B. Long. 2006. "Trigeminal Neuralgia." *TRIGEMINAL NEURALGIA 185 Journal of Long-Term Effects of Medical Implants* 16 (2): 185–92.
- Savernini, Átila, Natascha Savernini, Flávio Almeida de Amaral, Thiago Roberto Lima Romero, Igor Dimitri Gama Duarte, and Maria Saete Abreu de Castro. 2012. "Assay of Therapeutic Ultrasound Induced-Antinociception in Experimental Trigeminal Neuropathic Pain." *Journal of Neuroscience Research* 90 (8): 1639–45. <https://doi.org/10.1002/jnr.23056>.
- Scarabelot, Vanessa L., Carla de Oliveira, Liciane F. Medeiros, Isabel C. de Macedo, Stefania G. Cioato, Lauren Naomi S. Adachi, Ana Helena Paz, Andressa de Souza, Wolnei Caumo, and Iraci L.S. Torres. 2019. "Transcranial Direct-Current Stimulation Reduces Nociceptive Behaviour in an Orofacial Pain Model." *Journal of Oral Rehabilitation* 46 (1): 40–50. <https://doi.org/10.1111/joor.12726>.
- Segal, Dan, John K MacDonald, Nilesh Chande, K MacDonald John, and Nilesh Chande. 2014. "Low Dose Naltrexone for Induction of Remission in Crohn's Disease." *Cochrane Database of Systematic Reviews*, no. 2: 10–13. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD010410.pub2>.
- Sessle B., Lavigne G., Lund J., Dubner R. 2010. *Dor Orofacial*.
- Sharav, Rafael Benoliel & Yair. 2010. "Chronic Orofacial Pain." *Curr Pain Headache Rep* 14: 33–40. <https://doi.org/10.1111/odi.12540>.
- Silva, Guilherme D., Patrícia S.S. Lopes, Erich T. Fonoff, and Rosana L. Pagano. 2015. "The Spinal Anti-Inflammatory Mechanism of Motor Cortex Stimulation: Cause of Success and Refractoriness in Neuropathic Pain?" *Journal of Neuroinflammation* 12 (1): 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12974-014-0216-1>.
- Singh, Manish. 2016. "Trigeminal Neuralgia- Etiology," no. April: 396–420.

<http://emedicine.medscape.com/article/1145144-overview#a5>.

- Smith, Jill P., Sandra I. Bingaman, Francesca Ruggiero, David T. Mauger, Aparna Mukherjee, Christopher O. McGovern, and Ian S. Zagon. 2011. "Therapy with the Opioid Antagonist Naltrexone Promotes Mucosal Healing in Active Crohn's Disease: A Randomized Placebo-Controlled Trial." *Digestive Diseases and Sciences* 56 (7): 2088–97. <https://doi.org/10.1007/s10620-011-1653-7>.
- Spezia Adachi, Lauren N., Rafael Verdelino, Carla de Oliveira, Vanessa L. Scarabelot, Andressa de Souza, Liciane F. Medeiros, Stefania G. Cioato, Wolnei Caumo, and Iraci L.S. Torres. 2018. "Isoflurane and the Analgesic Effect of Acupuncture and Electroacupuncture in an Animal Model of Neuropathic Pain." *JAMS Journal of Acupuncture and Meridian Studies* 11 (3): 97–106. <https://doi.org/10.1016/j.jams.2018.01.004>.
- Tawfik, Dina Ibrahim, Afaf Sayed Osman, Hedayat Mahmoud Tolba, Aida Khattab, Lubna O. Abdel-Salam, and Mahmoud M. Kamel. 2016a. "Evaluation of Therapeutic Effect of Low Dose Naltrexone in Experimentally-Induced Crohn's Disease in Rats." *Neuropeptides* 59: 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2016.06.003>.
- . 2016b. "Evaluation of Therapeutic Effect of Low Dose Naltrexone in Experimentally-Induced Crohn's Disease in Rats." *Neuropeptides* 59: 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2016.06.003>.
- Toljan, Karlo, and Bruce Vrooman. 2018. "Low-Dose Naltrexone (LDN)—Review of Therapeutic Utilization." *Medical Sciences* 6 (4): 82. <https://doi.org/10.3390/medsci6040082>.
- Truini, Andrea, Luis Garcia-Larrea, and Giorgio Cruccu. 2013. "Reappraising Neuropathic Pain in Humans - How Symptoms Help Disclose Mechanisms." *Nature Reviews Neurology* 9 (10): 572–82. <https://doi.org/10.1038/nrneuro.2013.180>.
- Uddin, Olivia, Paige Studlack, Titilola Akintola, Charles Raver, Alberto Castro, Radi Masri, and Asaf Keller. 2018. "Amplified Parabrachial Nucleus Activity in a Rat Model of Trigeminal Neuropathic Pain." *Neurobiology of Pain* 3 (March): 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.ynpai.2018.02.002>.
- Wolf, Alban Latremoliere and Clifford J. 2010. "Central Sensitization: A Generator of Pain Hypersensitivity by Central Neural Plasticity." *Journal of Pain* 10 (9): 895–926. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2009.06.012>.Central.
- Wolf, Clifford J, and I Decosterd. 2000. "Spared Nerve Injury: An Animal Model of

- Persistent Peripheral Neuropathic Pain.” *Pain* 87: 149–58.
- Younger, Jarred, Luke Parkitny, and David McLain. 2014. “The Use of Low-Dose Naltrexone (LDN) as a Novel Anti-Inflammatory Treatment for Chronic Pain.” *Clinical Rheumatology* 33 (4): 451–59. <https://doi.org/10.1007/s10067-014-2517-2>.
- Zakrzewska, J M. 2009. “Practice Parameter : The Diagnostic Evaluation and Treatment of Trigeminal Neuralgia ( an Evidence-Based Review ).” <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000326598.83183.04>.
- Zakrzewska, Joanna M., and Roddy McMillan. 2011. “Trigeminal Neuralgia: The Diagnosis and Management of This Excruciating and Poorly Understood Facial Pain.” *Postgraduate Medical Journal* 87 (1028): 410–16. <https://doi.org/10.1136/pgmj.2009.080473>.
- Zhang, Yue, Dawei Zhu, Jilei Wang, Liangxin Yang, Liecheng Wang, and Yuanyin Wang. 2017. “Expression of Pannexin-1 in the Trigeminal Ganglion after Chronic Constriction Injury of the Infraorbital Nerve in a Rat Model.” *NeuroReport*, 1. <https://doi.org/10.1097/wnr.0000000000000958>.
- Zhang, Z., X. Wang, W. Wang, Y.-G. Lu, and Z. Z. Pan. 2013. “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.” *Molecular Pharmacology* 84 (4): 511–20. <https://doi.org/10.1124/mol.113.086496>.
- Zhong, Jun, Shi Ting Li, Jin Zhu, Hong Xin Guan, Qiu Meng Zhou, Wei Jiao, Ting Ting Ying, Xiao Sheng Yang, Wen Chuang Zhan, and Xu Ming Hua. 2012. “A Clinical Analysis on Microvascular Decompression Surgery in a Series of 3000 Cases.” *Clinical Neurology and Neurosurgery* 114 (7): 846–51. <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2012.01.021>.

## **6.2 ARTIGO 2**

### **“EVIDENCE ABOUT LOW-DOSE OF NALTREXONE IN RELIEVING TRIGEMINAL PAIN IN RATS”**

Será submetido ao periódico: Journal of Dental Research



# **EVIDENCE ABOUT LOW-DOSE OF NALTREXONE IN RELIEVING TRIGEMINAL PAIN IN RATS**

Camila Lino de Oliveira<sup>1,2,3</sup>, Liciane Fernandes Medeiros<sup>2,3,4</sup>, Vanessa Silva de Souza<sup>1,2,3</sup>, Bettega Costa Lopes<sup>2,3</sup>, Fabricio Finamor<sup>2,3</sup>, Luana Xavier Marques<sup>2,3</sup>, Iraci L. S. Torres<sup>1,2,3\*</sup>, Andressa de Souza<sup>1,4\*</sup>

<sup>1</sup>Postgraduate Program in Biological Sciences: Pharmacology and Therapeutics, Institute of Basic Health Sciences, Universidade Federal Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 90050-170, Brazil.

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

<sup>3</sup>Animal Experimentation Unit and Graduate Research Group, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS 90035-007, Brazil.

<sup>4</sup>Post-Graduate Program in Health and Human Development, Universidade Unilasalle, Canoas, RS 92010-000, Brazil.

\*Correspondence authors:

Andressa de Souza  
Av. Victor Barreto, 2288; Prédio 7.  
Canoas-RS, CEP. 92010-000.  
e-mail: [andressasz@gmail.com](mailto:andressasz@gmail.com)

Iraci LS Torres  
Departamento de Farmacologia - ICBS, UFRGS.  
Rua Sarmiento Leite, 500 sala 305.  
90050-170 - Porto Alegre, RS, Brasil.  
Phone: +55 (51) 3308 3183.  
e-mail: [iltorres@hcpa.edu.br](mailto:iltorres@hcpa.edu.br)

## ABSTRACT

Trigeminal neuralgia (TN) is a neuropathic pain characterized by intense pain, which has no cure. Anticonvulsants are the drugs of choice; however these drugs present side adverse effects that can decrease the patient adherence. In this study our objective was to evaluate the analgesic effect of low-dose of naltrexone (LDN) upon the mechanical facial hyperalgesia of rats submitted to chronic constriction of the infraorbital nerve (CCI-ION). The effects upon central levels of biomarkers (TNF- $\alpha$ , BDNF, IL-10, TLR4) were evaluated. Fifty-nine adult male Wistar rats were randomized by weight into seven groups: control group, sham pain+vehicle, sham pain+carbamazepine (100mg/kg), sham pain+naltrexone (0.5mg/kg), pain+vehicle, pain+carbamazepine (100mg/kg) and pain+naltrexone (0.5mg/kg). The mechanical hyperalgesia test was assessed at baseline, 7 and 14 days after surgery, 1h and 24h after the first dose of treatment and 1h after the last dose of treatment. All drugs were administered by gavage, once a day, for 10 days. This study was approved by CEUA-HCPA#2017-0575. Facial mechanical threshold between groups were similar at baseline (GEE,  $P>0.05$ ), and 7 days after surgery, the rats from sham and pain groups presented lower mechanical threshold than control group (GEE,  $P<0.05$ ). Fourteen days after surgery, only pain groups presented lower facial mechanical threshold, characterizing the TN model, and the treatments were started. Interesting to note that the first dose of LDN or carbamazepine partially reversed the facial mechanical hyperalgesia; however after 10 days of treatment, both drugs totally reversed the mechanical hyperalgesia. In addition, BDNF and IL-10 spinal cord levels were modulated by LDN differently in sham and pain groups. LDN may be an option to relieve orofacial neuropathic pain, however further studies are need to understand the exact mechanisms of analgesic effect of LDN.

**Keywords:** trigeminal pain, naltrexone, toll-like receptor, rats

## INTRODUCTION

Trigeminal neuralgia (TN) is the most prevalent orofacial neuropathy, which is characterized by intense pain. It is localized to the divisions of one or more branches of the trigeminal nerve orofacial regions innervated by this nerve (Sharav 2010; Kleef et al. 2009). The pain is accompanied by allodynia and paroxysmal attacks in the affected region (Haviv et al. 2016; Zakrzewska and McMillan 2011). The pathophysiology of TN is not fully elucidated, but is believed to occur through a process of demyelination or neurovascular compression, it is responsible for up to 90% of TN cases (Leclercq et al. 2013; McLaughlin et al. 1999).

Currently there is no cure for TN (Allsop et al. 2015). The anticonvulsants are the drugs of choice, among them carbamazepine, which is first choice of NT treatment (Zakrzewska and McMillan 2011). The anticonvulsants act by reducing the excitability of ectopic nerve impulses by inhibiting sodium and calcium channel activity with resultant membrane stabilization. It causes reduction in the pain intensity, the pain paroxysms and the triggering stimuli by contact with trigger points (Cruccu et al. 2008). However, 30% of patients do not respond to drug treatment or tolerate its side effects (Finnerup et al. 2005; Edlich et al. 2006; Attal et al. 2006). Considering these factors, it is important the search for new therapeutic options in the treatment of trigeminal neuralgia. A possible option de new NT therapy can be the use of low doses of naltrexone.

Naltrexone is a competitive opioid receptor antagonist, which was approved by the Food and Drugs Administration (FDA) in 1984 for the treatment of opioid and alcohol dependence (Patten et al. 2018). The use of low doses of naltrexone ranging from 1.5 mg to 3 mg was first used in the 1990s in patients with acquired immunodeficiency syndrome, where an immunomodulatory effect was observed (Patten et al. 2018; Toljan and Vrooman 2018). The mechanism of action of low doses of naltrexone is related to glial

modulation with neuroprotective effect, inducing inhibition microglia activation, which would produce inflammatory agents, activating pro-inflammatory cascade. This effect was observed only at doses ranging from 1 mg to 5mg.

Naltrexone also binds to the Toll-like 4 receptor (TLR4) present in the microglia, acting as an antagonist of this receptor (Toljan and Vrooman 2018; Younger et al. 2014). By blocking TLR4, naltrexone inhibits the production of pro-inflammatory cytokines interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), as well as the inflammatory factor nitric oxide (NO), which contributes to painful sensitization via nociceptive signal processing, resulting in analgesic effect and anti-inflammatory (Toljan and Vrooman 2018; Li et al. 2018). In addition, instead of producing a permanent opioid receptor blockade, as in the usual doses, the use of lower doses results in transient opioid receptor blockade (Segal et al. 2014). This receptor remains blockade for 4 to 6 hours, leading to an increase in endogenous opioid production synthesis (Patten et al. 2018). Additionally, it also occurs an increase in the density of  $\mu$ -type opioid receptors increasing endorphins and enkephalin effects (Patten et al. 2018).

In this way, considering the need for new therapies for the treatment of trigeminal neuralgia, the aim of this study was to evaluate the analgesic effect of low-dose of naltrexone upon the facial mechanical hyperalgesia of rats submitted to a model orofacial neuropathic pain. In addition, we evaluated the levels of TNF- $\alpha$ , BDNF, IL-10, and TLR4 in the brainstem and spinal cord of these rats.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Animals**

Fifty-nine male Wistar rats weighing between 240-300g were used in this study. The rats were randomized by weight, and three animals per were housed in polypropylene cages

(49 × 34 × 16 cm), with sawdust-covered floors, and a maximum number of four rats per box. Rats were maintained on a standard 12:12 light–dark cycle (lights on at 07:00h and lights off at 19:00h), at room temperature (22 ± 2°C), with water and chow (Nuvital, Porto Alegre, Brazil) available *ad libitum*. All experiments and procedures were approved by the Institutional Committee for Animal Care and Use (GPPG-HCPA protocol N° 2017-0575) and conformed to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals 8th ed. 2011 and law 11.794 (Brazil). The experimental protocol complied with the ethical and methodological standards of the ARRIVE guidelines (Kilkenny et al. 2013).

## **Drugs**

Carbamazepine 400 mg tablets (EMS, Brazil): the tablets were crushed and dissolved in saline (0.9%) for a final concentration of 100 mg/kg (Chogtu et al. 2011). Naltrexone (Naltrexone Hydrochloride 100mg, Abcam) was dissolved in saline (0.9%) for a final concentration of 0.5mg/kg (Tawfik et al. 2016). Saline (0.9%) was used as a vehicle. Were used in the doses as per the previous study.

## **Experimental design**

The experimental design was made according to Figure 1. Briefly, after 14 days of habituation, rats were weighed and randomized into seven groups: the total control group (C), which was not manipulated; sham pain + vehicle (SV), were received the saline 1 ml daily; sham pain + carbamazepine (SC), were received carbamazepine (100 mg/kg/day); sham pain + naltrexone (SN), received naltrexone (0.5 mg/kg/day); pain + vehicle (PV), received saline 1 ml daily by oral gavage, for 10 days; pain + carbamazepine (PC), they received carbamazepine (100 mg/kg/day); pain + naltrexone (PN), were received naltrexone (0.5 mg/kg/day). The facial mechanical hyperalgesia test was assessed at

baseline, 7 and 14 days after surgery, 1h and 24h after the first dose of treatment and 1h after the last dose of treatment. The trigeminal neuralgia was induced by chronic constriction of the infraorbital nerve (CCI-ION) at day 0. The establishment of orofacial neuropathic was confirmed by Von Frey test at 14<sup>th</sup> day after surgery. Treatment was administered 14 days after CCI-ION and all drugs were administered by oral gavage during 10 days.

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

### **Orofacial Neuropathic Pain model**

The pain model used to induce trigeminal neuralgia involved chronic constriction of the infraorbital nerve (CCI-ION) and was adapted from the model proposed previously (Imamura, Kawamoto, and Nakanishi 1997). Anesthesia was induced using ketamine (50 mg/kg i.p.) and xylazine (10 mg/kg i.p.). Anesthesia was maintained with isoflurane (2% inhalation). Surgical access was made by an intraoral incision on the right side 0.5 mm from the insertion of the first molar and extended along the vestibular mucosa for 1 cm in the anterior direction. The tissues were removed, and the infraorbital nerve was exposed and isolated. Two ligatures were made with a 2 mm distance between them using a 4-0 Silk suture. After the ligation was performed, the incision was sutured. The animals were housed in a heated incubator until recovery from anesthesia. Rats from the sham pain group underwent the same procedure of anesthesia, surgical access, and suture, but without nerve constriction. After surgery, tramadol hydrochloride (20 mg/kg, i.p.) was

administered at 12h intervals for the first 72h for relieving pain to minimize the animal's discomfort.

### **Von Frey test**

Mechanical hyperalgesia of the right vibrissal whisker pad was verified using an automatic von Frey aesthesiometer (Insight, São Paulo, Brazil). This test entails perpendicular pressure made with a plastic filament over the vibrissae area. The force required for an animal to exhibit pain-like behavior with face withdrawal was registered; three measures were averaged in intervals of 5 min. The pain threshold is equivalent to the mean of the three measures and is expressed in grams. All tests were performed by the same investigator, which was blinded for treatment group.

### **Tissue collection**

Rats were killed by decapitation at 24 hours after the end of treatment. The brainstem and spinal cord was collected and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for later analysis.

### **Biochemical assays**

The brainstem and spinal cord levels of BDNF, TNF- $\alpha$ , IL-10 were analyzed using a commercial ELISA kit (mouse enzyme assay; R&D Systems, Minneapolis, USA), and TLR4 were analyze using a commercial ELISA kit (Rat toll-like receptor 4, TLR4 ELISA Kit; My BioSource, San Diego, USA). Brainstem and spinal cord tissue was homogenized with a handheld homogenizer with 1:10 Protease Inhibitor Cocktail (Sigma® #P8340) and centrifuged for 5 min at 10,000 rpm. Total protein was measured by Bradford method (Bradford 1976). The results were expressed as pg/mg of protein.

## **Statistical Analysis**

A generalized estimating equation (GEE) followed by Bonferroni test was performed to analyze nociceptive behavior. Two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni was performed to compare the BDNF, TNF- $\alpha$  and IL-10 levels between groups. One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Student Newman Keuls (SNK) was performed to compare TLR-4 levels between groups. The data were expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean (S.E.M.) and considered significant at  $P < 0.05$ . SPSS Statistics version 20, Armonk, NY, USA for Windows was used for the statistical analyses.

## **RESULTS**

### **Mechanical hyperalgesia**

In the mechanical hyperalgesia data evaluation, there is interaction time x group ( $\chi^2 = 1314.970$ ; 30;  $P < 0.001$ ). At baseline, there was not difference in the facial mechanical threshold between groups ( $P > 0.05$ ). At 7<sup>th</sup> day after CCI-ION, rats subjected to sham-CCI-ION and CCI-ION groups showed was a reduction in the facial mechanical threshold compared to control group ( $P < 0.01$ ). At 14<sup>th</sup> day after CCI-ION, rats subjected to CCI-ION group showed reduction in the facial mechanical threshold compared to control and sham-CCI-ION groups ( $P < 0.001$ ). And, it is interesting to note that, at 14<sup>th</sup> day after CCI-ION, the sham-CCI-ION groups presented similar facial threshold to control group ( $P > 0.01$ ). After the 1<sup>st</sup> dose of treatments, rats subjected to CCI-ION and treated with carbamazepine and low dose of naltrexone showed partial reversion of the facial mechanical threshold ( $P < 0.001$ ). And similar results were found in the same groups when we assessed the facial mechanical threshold at 24h after the 1<sup>st</sup> dose. However, at the last measurement, rats subjected to CCI-ION and treated with carbamazepine and low dose



of naltrexone showed complete reversion of the mechanical hyperalgesia ( $P>0.05$ ). Thus, low-dose naltrexone treatment reversed the mechanical hyperalgesia of rats exposed to an orofacial neuropathic pain model, showing an analgesic effect, as similar to positive control like carbamazepine (figure 2).

----- Insert figure 2 -----

## **Biochemical analysis**

### **BDNF levels**

BDNF levels were measured in the brainstem and spinal cord of rats. In the spinal cord, there was an interaction between the independent variable: orofacial neuropathic pain, and treatment (two-way ANOVA/SNK,  $F_{(2,28)}=4.914$ ,  $P<0.05$ ,  $n=35$ ). We observed that the sham-pain plus naltrexone (SN) group had increased BDNF levels, which was reversed in the pain plus naltrexone (PN) group. In the brainstem, there was not interaction between the independent variables (two-way ANOVA/SNK,  $F_{(2,28)}=0.165$ ,  $P>0.05$ ,  $n=35$ ) (Figure 3 and table 1).

----- Insert figure 3 -----

### **IL-10 levels**

The IL-10 levels were measured in the brainstem and spinal cord. In the spinal cord, there was interaction between the independent variable: orofacial neuropathic pain, and treatment (two-way ANOVA/SNK,  $F(2,28)=4.495$ ,  $p<0.05$ ,  $n=35$ ). We observed that the sham-pain plus naltrexone (SN) group had increased IL-10 levels, which was reversed in the pain plus naltrexone (PN) group. In the brainstem, there was not interaction

between the independent variables: orofacial neuropathic pain, and treatment (two-way ANOVA/ SNK,  $F_{(2, 28)} = 0.20$ ,  $P > 0.05$ ) (Figure 4 and table 1).

----- Insert figure 4 -----

#### **TNF- $\alpha$ levels**

The TNF- $\alpha$  levels were measured in the brainstem and spinal cord. In the spinal cord, there was not interaction between the independent variable: orofacial neuropathic pain, and treatment (two-way ANOVA/ SNK,  $F_{(2,28)} = 0.798$ ,  $P > 0.05$ ). In the brainstem, there was not interaction between the independent variables: orofacial neuropathic pain, and treatment (two-way ANOVA/ SNK,  $F_{(2, 28)} = 0.035$ ,  $P > 0.05$ ) (Table 1).

#### **TLR-4 levels**

The TLR-4 levels were measured in the brainstem and spinal cord. No difference was observed in spinal cord TLR-4 levels 24h after the end of the treatment: [one-way ANOVA,  $P > 0.05$ ; control group ( $1.208 \pm 0.074$ ); sham-pain plus vehicle ( $0.848 \pm 0.1023$ ); sham-pain plus carbamazepine ( $1.286 \pm 0.127$ ); sham-pain plus naltrexone ( $1.461 \pm 0.246$ ); pain plus vehicle ( $1.261 \pm 0.165$ ); pain plus carbamazepine ( $1.291 \pm 0.104$ ); pain plus naltrexone ( $1.078 \pm 0.132$ )]; similar results we found in the brainstem TLR-4 levels [one-way ANOVA,  $P > 0.05$ ; control group ( $1.195 \pm 0.174$ ); sham-pain plus vehicle ( $1.451 \pm 0.278$ ); sham-pain plus carbamazepine ( $1.090 \pm 0.258$ ); sham-pain plus naltrexone ( $0.823 \pm 0.085$ ); pain plus vehicle ( $0.956 \pm 0.149$ ); pain plus carbamazepine ( $1.150 \pm 0.205$ ); pain plus naltrexone ( $0.676 \pm 0.012$ )].

----- Insert table 1 -----

## **DISCUSSION**

According to our findings, single doses of LDN or carbamazepine were able to partially revert the facial mechanical hyperalgesia induced by chronic constriction of the infraorbital nerve. Interestingly, after repeated LDN treatment (10 days), the facial hypernociceptive behavior was totally reversed; the pain groups that received LDN or carbamazepine showed facial mechanical threshold similar to control group. In addition, we found that LDN is able to modulate BDNF and IL-10 spinal cord levels differently according of the animal state, for example, its levels increased in sham-pain group and decreased in pain group. In addition, there is no significant difference was found in the TLR4 levels; at least in the structures were measured, contrary to what the literature suggests relating the mechanism of action of naltrexone to TLR4 (Patten et al. 2018).

In this context, it is important to highlight that a single dose of LDN promoted analgesia after first dose, as observed in figure 2. Thus, future studies could more deeply investigate the use of LDN for acute pain. On the other hand, repeated treatment with LDN reversed totally the hypernociceptive behavior of rats with TN. This result corroborates clinical previous studies that demonstrated the analgesic effect of LDN in pain conditions (Parkitny and Younger 2017; Younger 2009; Smith et al. 2011)(Parkitny and Younger 2017; Jarred Younger 2009; Smith et al. 2011). Previous studies showed that co-administration of ultra-low doses of naltrexone and pregabalin or gabapentin reduced spinal nerve ligation-induced tactile allodynia (Pineda-Farias et al. 2017). Naltrexone produces part of its antiallodynic effect or synergistic interaction by activation of opioid receptors (Pineda-Farias et al. 2017), especially through blockade of mu-opioid receptors (Patten et al. 2018).

It is known that opioid medications in rats are able to induce TLR4 signaling, which can lead to opioid-induced pro-inflammatory effects (Patten et al. 2018). Glial cells

such as astrocytes and microglia are importantly involved in neuropathic pain (Watkins et al. 2007). Furthermore, low-dose naltrexone is known to act as a glial modulator, binding specifically to the TLR4, acting as an antagonist (Toljan and Vrooman 2018). However, our study found no difference in brainstem and spinal cord TLR4 levels in the groups receiving LDN.

It is important to note that the establishment of chronic pain involves a cascade of wide variety factors, including, increase proinflammatory interleukins levels, which sensitizes nociceptors (Leung and Cahill 2010). Therefore, these algogenic substances also promote CNS sensitization, promoting changes in pain neuromatrix and poorly adaptive response (Baron 2006). In our study, the animals submitted to trigeminal pain model that received LDN had no significant decrease ( $P > 0.05$ ) in the TNF- $\alpha$  levels. Thereby, this findings corroborate our previous study (Callai et al. 2019), which found alterations in the pro-inflammatory interleukins levels in rats submitted to same pain model. Interestingly, TNF- $\alpha$  is a cytokine related to the pathogenesis of peripheral and central neuropathic pain. In a study of the chronic sciatic constriction model in rats, TNF- $\alpha$  was detected at the injury site and was over stimulated over time (Leung and Cahill 2010). Meanwhile, when we treated the pain group with LDN, there was a significant decrease of this biomarker. Consequently, we can suggest that the decrease in TNF levels contribute with the increase in pain thresholds observed in the Von Frey test, since the decreasing pro-inflammatory interleukin levels are involved in neuropathic pain processes (Leung and Cahill 2010). This finding was corroborated by carbamazepine treatment, as gold standard (Gronseth et al. 2008). The carbamazepine pain group also changed the pattern of interleukins, but still the response of LDN it was more robust.

It is well known the pronociceptive role of BDNF in the inflammatory and neuropathic pain processes (Zhang et al. 2013). Trigeminal pain also presents alterations

in neurotrophin homeostasis stimulating maladaptive neuroplastic responses that may hinder pain treatment (Scarabelot et al. 2019). In our current study, we observed an interesting interaction between orofacial neuropathic pain and treatment. Pain-free rats that received LDN showed higher levels of BDNF in the spinal cord, and pain group plus LDN showed lower levels of this neurotrophin, indicating an effect dependent of animal status. This result corroborate our previous study, when we showed this same interaction between different treatments and pain animal models (Spezia Adachi et al. 2018).

In the same way, we observed an interaction between pain and treatment in spinal cord IL-10 levels of rats, where pain-free rats that received LDN showed higher levels, and pain group plus LDN showed lower levels of IL-10. Interleukin-10 is an anti-inflammatory cytokine released at a late stage of the inflammatory process. It has a protective function; preventing excessive tissue damage caused by inflammation (Ouyang et al. 2011; Tabas 2013), and is related to neuropathic pain (Khan et al. 2015). Parkitny and Younger (2017) demonstrated that LDN decrease pro-inflammatory cytokines. But, it looks this is the first time like effect was demonstrated on brain structures. Brainstem changes show the central sensitization processors via cytokine signaling. Alterations of these spinal cord cytokines suggest that there is a communication between structures.

Interesting to note as well that it was found the influence of age on the analgesic effect of co-administration of morphine and ultra-low doses of naloxone which was greater in female than in male rats (Hamann et al. 2004). In this context, in the current study, we just used adult males rats to assess the analgesic effect of LDN, characterizing as a limitation of our study.

In conclusion, the present findings indicate that single dose of LDN showed is less effective of relieving TN of rats than repeated doses of LDN (10 doses); and the antiallodynic effect of LDN was not directly linked to TL4R located in the spinal cord

and brainstem of rats, at least. In addition, the animal status can influence the effect of LDN in the BDNF and IL-10 levels of spinal cord of rats. Thus, further studies are necessary to elucidate the action mechanism of the antiallodynic effect of LDN in different conditions of animal pain models.

## **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

C.L. de Oliveira contributed to conception, design, data acquisition, analysis, and interpretation, drafted and critically revised the manuscript. L.F. Medeiros contributed to design and data analysis drafted and critically revised the manuscript. V.S. Souza, B.C. Lopes, F. Finamor, L.X. Marques contributed to design and developed the study. I. L.S. Torres contributed to conception, design, data analysis and interpretation, drafted and critically revised the manuscript. A. Souza contributed to conception, design, data analysis and interpretation, drafted, critically revised the manuscript and coordinated the study. All authors gave final approval and agree to be accountable for all aspects of the work.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

This work was supported by the following Brazilian funding agencies: National Council for Scientific and Technological Development - CNPq (Dr. I.L.S.Torres); Committee for the Development of Higher Education Personnel - CAPES; PROPESq/UFRGS (L. X.r Marques); Edital FAPERGS DocFix/CAPES 04/2018. Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education—CAPES (C. L. de Oliveira; V.S.Souza), Graduate Research Group (GPPG) of Hospital de Clínicas de Porto Alegre—HCPA (I.L.S.Torres – Grant number 2017-0575).

## **CONFLICT OF INTEREST**

The authors declare no conflict of interest.

## REFERENCES

- Allsop, Matthew J., Maureen Twiddy, Hilary Grant, Carolyn Czoski-Murray, Mark Mon-Williams, Faisal Mushtaq, Nick Phillips, Joanna M. Zakrzewska, and Sue Pavitt. 2015. "Diagnosis, Medication, and Surgical Management for Patients with Trigeminal Neuralgia: A Qualitative Study." *Acta Neurochirurgica* 157 (11): 1925–33. <https://doi.org/10.1007/s00701-015-2515-4>.
- Attal, N., G. Cruccu, M. Haanpää, P. Hansson, T. S. Jensen, T. Nurmikko, C. Sampaio, S. Sindrup, and P. Wiffen. 2006. "EFNS Guidelines on Pharmacological Treatment of Neuropathic Pain." *European Journal of Neurology* 13 (11): 1153–69. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2006.01511.x>.
- Attal, Nadine, Michel Lanteri-Minet, Bernard Laurent, Jacques Fermanian, and Didier Bouhassira. 2011. "The Specific Disease Burden of Neuropathic Pain: Results of a French Nationwide Survey." *Pain* 152 (12): 2836–43. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2011.09.014>.
- Baron, Ralf. 2006. "Mechanisms of Disease: Neuropathic Pain - A Clinical Perspective." *Nature Clinical Practice Neurology* 2 (2): 95–106. <https://doi.org/10.1038/ncpneuro0113>.
- Binder, Devin K, and Helen E Scharfman. 2004. "Brain-Derived Neurotrophic Factor." *Growth Factors (Chur, Switzerland)* 22 (3): 123–31. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2008.05.010>.
- Blom, S. 1962. "Trigeminal Neuralgia: Its Treatment With a New Anticonvulsant Drug (G-32883)." *The Lancet* 279 (7234): 839–40. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(62\)91847-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(62)91847-0).
- Bogduk, Harold Marskey; Nikolai. 1994. "Classification of Chronic Pain- Descriptions of Chronic Pain Syndromes and Definitions of Pain Terms."
- Bostock, H., M. Campero, J. Serra, and J. L. Ochoa. 2005. "Temperature-Dependent Double Spikes in C-Nociceptors of Neuropathic Pain Patients." *Brain* 128 (9): 2154–63. <https://doi.org/10.1093/brain/awh552>.
- Bouhassira, Didier, Michel Lantéri-Minet, Nadine Attal, Bernard Laurent, and Chantal Touboul. 2008. "Prevalence of Chronic Pain with Neuropathic Characteristics in the General Population." *Pain* 136 (3): 380–87. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2007.08.013>.
- Bradford, Marion. 1976. "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of



- Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding.” *Analytical Biochemistry* 72: 248–54. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- Brietzke, Aline P., Joanna R. Rozisky, Jairo A. Dussan-Sarria, Alicia Deitos, Gabriela Laste, Priscila F.T. Hoppe, Suzana Muller, et al. 2016. “Neuroplastic Effects of Transcranial Direct Current Stimulation on Painful Symptoms Reduction in Chronic Hepatitis C: A Phase II Randomized, Double Blind, Sham Controlled Trial.” *Frontiers in Neuroscience* 9 (JAN): 1–9. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00498>.
- Brown, Norman, and Jaak Panksepp. 2009. “Low-Dose Naltrexone for Disease Prevention and Quality of Life.” *Medical Hypotheses* 72 (3): 333–37. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2008.06.048>.
- Callai, Etiane Micheli Meyer, Vanessa Leal Scarabelot, Liciane Fernandes Medeiros, Carla de Oliveira, Andressa de Souza, Isabel Cristina Macedo, Stefania Giotti Cioato, et al. 2019. “Transcranial Direct Current Stimulation (TDCS) and Trigeminal Pain: A Preclinical Study.” *Oral Diseases* 25 (3): 888–97. <https://doi.org/10.1111/odi.13038>.
- Cheol Moon, Hyeong, Won Ik Heo, Yon Ji Kim, Dae Lee, So Yoon Won, Hong Rae Kim, Seung Man Ha, Youn Joo Lee, and Young Seok Park. 2017. “Optical Inactivation of the Anterior Cingulate Cortex Modulate Descending Pain Pathway in a Rat Model of Trigeminal Neuropathic Pain Created via Chronic Constriction Injury of the Infraorbital Nerve.” *Journal of Pain Research*, 10–2355. <https://doi.org/10.2147/JPR.S138626>.
- Chogtu, Bharti, K L Bairy, D Smitha, Supurna Dhar, and P Himabindu. 2011. “Comparison of the Efficacy of Carbamazepine, Gabapentin and Lamotrigine for Neuropathic Pain in Rats.” *Indian Journal of Pharmacology* 43 (5): 596–98. <https://doi.org/10.4103/0253-7613.84980>.
- Choi, Byung Moon; Lee, Soo Han; An, Sang Mee; Park, Do Yang; Lee, Gwan Woo; Noh, Gyu-Jeong. 2015. “The Time-Course and RNA Pain Induced by L5 Spinal Nerve IL-1 $\beta$  Expression on Neuropathic Interference of TNF- $\alpha$ , IL-6, and Transection in Rats.” *Korean Journal of Anesthesiology* 68 (2): 159–69.
- Cioato, Stefania Giotti, Liciane Fernandes Medeiros, Paulo Ricardo Marques Filho, Rafael Vercelino, Andressa De Souza, Vanessa Leal Scarabelot, Carla De Oliveira, et al. 2016. “Long-Lasting Effect of Transcranial Direct Current Stimulation in the Reversal of Hyperalgesia and Cytokine Alterations Induced by the Neuropathic Pain

- Model.” *Brain Stimulation* 9 (2): 209–17. <https://doi.org/10.1016/j.brs.2015.12.001>.
- Costa, Grazielle Mara Ferreira, and Camila Megale De Almeida Leite. 2015. “Trigeminal Neuralgia: Peripheral and Central Mechanisms.” *Revista Dor* 16 (4): 297–301. <https://doi.org/10.5935/1806-0013.20150061>.
- Cree, Bruce A.C., Elena Kornyeveva, and Douglas S. Goodin. 2010. “Pilot Trial of Low-Dose Naltrexone and Quality of Life in Multiple Sclerosis.” *Annals of Neurology* 68 (2): 145–50. <https://doi.org/10.1002/ana.22006>.
- Cruccu, G., A. Biasiotta, F. Galeotti, G. D. Iannetti, P. Innocenti, A. Romaniello, and A. Truini. 2006. *Chapter 14 Diagnosis of Trigeminal Neuralgia: A New Appraisal Based on Clinical and Neurophysiological Findings. Supplements to Clinical Neurophysiology*. Vol. 58. Elsevier B.V. [https://doi.org/10.1016/S1567-424X\(09\)70067-4](https://doi.org/10.1016/S1567-424X(09)70067-4).
- Cruccu, G., G. Gronseth, J. Alksne, C. Argoff, M. Brainin, K. Burchiel, T. Nurmikko, and J. M. Zakrzewska. 2008. “AAN-EFNS Guidelines on Trigeminal Neuralgia Management.” *European Journal of Neurology* 15 (10): 1013–28. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2008.02185.x>.
- Devor, Marshall, Ron Amir, and Z. Harry Rappaport. 2002. “Pathophysiology of Trigeminal Neuralgia: The Ignition Hypothesis.” *Clinical Journal of Pain* 18 (1): 4–13. <https://doi.org/10.1097/00002508-200201000-00002>.
- Dieleman, Jeanne P., Joost Kerklaan, Frank J P M Huygen, Paul A D Bouma, and Miriam C J M Sturkenboom. 2008. “Incidence Rates and Treatment of Neuropathic Pain Conditions in the General Population.” *Pain* 137 (3): 681–88. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2008.03.002>.
- Filho, Paulo Ricardo Marques, Rafael Vercelino, Stefania Giotti Cioato, Liciane Fernandes Medeiros, Carla de Oliveira, Vanessa Leal Scarabelot, Andressa Souza, et al. 2016. “Transcranial Direct Current Stimulation (TDCS) Reverts Behavioral Alterations and Brainstem BDNF Level Increase Induced by Neuropathic Pain Model: Long-Lasting Effect.” *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 64: 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2015.06.016>.
- Finnerup, N. B., M. Otto, H. J. McQuay, T. S. Jensen, and S. H. Sindrup. 2005. “Algorithm for Neuropathic Pain Treatment: An Evidence Based Proposal.” *Pain* 118 (3): 289–305. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2005.08.013>.
- Fruhstorfer, H., W. Gross, and O. Selbmann. 2001. “Von Frey Hairs: New Materials for a New Design.” *European Journal of Pain* 5 (3): 341–42.

<https://doi.org/10.1053/eujp.2001.0250>.

- G. Gronseth, G. Cruccu, J. Alksne, C. Argoff, M. Brainin, K. Burchiel, T. Nurmikko, J.M. Zakrzewska. 2008. "Practice Parameter: The Diagnostic Evaluation and Treatment of Trigeminal Neuralgia (an Evidence-Based Review): Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the European Federation of Neurological Societies." *Neurology* 71 (15): 1183–90. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000326598.83183.04>.
- Gironi, M., F. Martinelli-Boneschi, P. Sacerdote, C. Solaro, M. Zaffaroni, R. Cavarretta, L. Moiola, et al. 2008. "A Pilot Trial of Low-Dose Naltrexone in Primary Progressive Multiple Sclerosis." *Multiple Sclerosis* 14 (8): 1076–83. <https://doi.org/10.1177/1352458508095828>.
- Hamann, Scott R., Hammad Malik, Jewell W. Sloan, and Elzbeita P. Wala. 2004. "Interactions of 'Ultra-Low' Doses of Naltrexone and Morphine in Mature and Young Male and Female Rats." *Receptors and Channels* 10 (2): 73–81. <https://doi.org/10.1080/10606820490464334>.
- Hanka, Haber. 1996. "Alcohol Induces Formation of Morphine Precursors in the Striatum of Rats" 60 (5).
- Haviv, Y., J. Khan, A. Zini, G. Almoznino, Y. Sharav, and R. Benoliel. 2016. "Trigeminal Neuralgia (Part I): Revisiting the Clinical Phenotype." *Cephalalgia* 36 (8): 730–46. <https://doi.org/10.1177/0333102415611405>.
- Ibrahim, Suzan. 2014. "Trigeminal Neuralgia: Diagnostic Criteria, Clinical Aspects and Treatment Outcomes. A Retrospective Study." *Gerodontology* 31 (2): 89–94. <https://doi.org/10.1111/ger.12011>.
- Imamura, Yoshiki, Hiroya Kawamoto, and Osamu Nakanishi. 1997. "Characterization of Heat-Hyperalgesia in an Experimental Trigeminal Neuropathy in Rats." *Experimental Brain Research* 116 (1): 97–103. <https://doi.org/10.1007/PL00005748>.
- Ira Tabas, Christopher K. Glass. 2013. "Anti-Inflammatory Therapy in Chronic Disease: Challenges and Opportunities." *Science* 11 (6116): 166–72. <https://doi.org/10.1126/science.1230720>. Anti-Inflammatory.
- Jarred Younger, Sean Mackey. 2009. "Fibromyalgia Symptoms Are Reduced by Low-Dose Naltrexone: A Pilot Study." *Pain Med* 10 (4): 663–72. <https://doi.org/10.1111/j.1526-4637.2009.00613.x>. Fibromyalgia.
- Junad Khan, Khaled Ramadan, Olga Korczeniewska, Muhammad Moin Anwer, Rafael

- Benoliela, Eli Eliav. 2015. "Interleukin-10 Levels in Rat Models of Nerve Damage and Neuropathic Pain." *Neuroscience Letters* 592: 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.07.049>.
- Kilkenny, Carol, William J. Browne, Innes C. Cuthill, Michael Emerson, and Douglas G. Altman. 2013. "Improving Bioscience Research Reporting: The Arrive Guidelines for Reporting Animal Research." *Animals* 4 (1): 35–44. <https://doi.org/10.3390/ani4010035>.
- Kirkpatrick, D. B. 1989. "Familial Trigeminal Neuralgia: Case Report." *Neurosurgery* 24 (5): 758–61.
- Kleef, Maarten van; Genderen, Wilco E. van; Narouze, Sem; Nurmikko, Turo J; Zundert, Jan van; Geurts, José W; Mekhail, Nagy. 2009. "Trigeminal Neuralgia." *Pain Practice* 9 (4): 308–11. <https://doi.org/10.1111/j.1533-2500.2009.00288.x>.
- Krafft, Rudolph M. 2008. "Trigeminal Neuralgia." *Am Fam Physician* 77 (9): 1291–96.
- Leclercq, D., J.-B. Thiebaut, and F. Héran. 2013. "Trigeminal Neuralgia." *Diagnostic and Interventional Imaging* 94 (10): 993–1001. <https://doi.org/10.1016/j.diii.2013.08.002>.
- Lee, John Y. K., John T. Pierce, Sukhmeet K. Sandhu, Dmitriy Petrov, and Andrew I. Yang. 2016. "Endoscopic versus Microscopic Microvascular Decompression for Trigeminal Neuralgia: Equivalent Pain Outcomes with Possibly Decreased Postoperative Headache after Endoscopic Surgery." *Journal of Neurosurgery* 126 (5): 1676–84. <https://doi.org/10.3171/2016.5.jns1621>.
- Leung, Lawrence, and Catherine M Cahill. 2010. "TNF-Alpha and Neuropathic Pain--a Review." *Journal of Neuroinflammation* 7 (Cci): 27. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-7-27>.
- Li, K. W., D. S. Kim, F. Zaucke, and Z. D. Luo. 2014. "Trigeminal Nerve Injury-Induced Thrombospondin-4 up-Regulation Contributes to Orofacial Neuropathic Pain States in a Rat Model." *European Journal of Pain (United Kingdom)* 18 (4): 489–95. <https://doi.org/10.1002/j.1532-2149.2013.00396.x>.
- Li, Kang Wu, Yanhui Peter Yu, Chunyi Zhou, Doo Sik Kim, Bin Lin, Kelli Sharp, Oswald Steward, and Z. David Luo. 2014. "Calcium Channel A2δ1 Proteins Mediate Trigeminal Neuropathic Pain States Associated with Aberrant Excitatory Synaptogenesis." *Journal of Biological Chemistry* 289 (10): 7025–37. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.548990>.
- Li, Zijian, Yue You, Noreen Griffin, Juan Feng, and Fengping Shan. 2018. "Low-Dose

- Naltrexone (LDN): A Promising Treatment in Immune-Related Diseases and Cancer Therapy.” *International Immunopharmacology* 61 (36): 178–84. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.05.020>.
- Linda R. Watkins, Mark R. Hutchinson, Annemarie Ledebøer, Julie Wieseler-Frank, Erin D. Milligan, and Steven F. Maier. 2007. “Glia as the ‘Bad Guys’: Implications for Improving Clinical Pain Control and the Clinical Utility of Opioids.” *Brain Behav Immun.* 21 (2): 131–46. <https://doi.org/doi:10.1016/j.bbi.2006.10.011>.
- Love, S, and H B Coakham. 2001. “Trigeminal Neuralgia: Pathology and Pathogenesis.” *Brain: A Journal of Neurology* 124 (Pt 12): 2347–60. <https://doi.org/10.1093/brain/124.12.2347>.
- Luiz, A. P., S. D. Schroeder, G. A. Rae, J. B. Calixto, and J. G. Chichorro. 2015. “Contribution and Interaction of Kinin Receptors and Dynorphin A in a Model of Trigeminal Neuropathic Pain in Mice.” *Neuroscience* 300: 189–200. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.05.015>.
- M’Dahoma, Saïd, Matthieu Poitevin, Eric Dabala, Hugo Payan, Cecilia Gabriel, Elisabeth Mocaër, Sylvie Bourgoïn, and Michel Hamon. 2018. “A 2 - and B 2 - Adrenoreceptor-Mediated Efficacy of the Atypical Antidepressant Agomelatine Combined With Gabapentin To Suppress Allodynia in Neuropathic Rats With Ligated Infraorbital or Sciatic Nerve.” *Frontiers in Pharmacology* 9 (JUN): 1–17. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00587>.
- Maarbjerg, Stine, Aydin Gozalov, Jes Olesen, and Lars Bendtsen. 2014. “Trigeminal Neuralgia-a Prospective Systematic Study of Clinical Characteristics in 158 Patients.” *Headache* 54 (10): 1574–82. <https://doi.org/10.1111/head.12441>.
- Maarbjerg, Stine, Giulia Di Stefano, Lars Bendtsen, and Giorgio Cruccu. 2017. “Trigeminal Neuralgia - Diagnosis and Treatment.” *Cephalalgia* 37 (7): 648–57. <https://doi.org/10.1177/0333102416687280>.
- McLaughlin, Mark R., Peter J. Jannetta, Brent L. Clyde, Brian R. Subach, Christopher H. Comey, and Daniel K. Resnick. 1999. “Microvascular Decompression of Cranial Nerves: Lessons Learned after 4400 Operations.” *Journal of Neurosurgery* 90 (1): 1–8. <https://doi.org/10.3171/jns.1999.90.1.0001>.
- Merskey, Harold. Bogduk, Nikolai. 2011. “Classification of Chronic Pain.” *IASP PRESS*, 222.
- Michot, Benoit, Ronald Deumens, and Emmanuel Hermans. 2017. “Immunohistochemical Comparison of Astrocytic MGluR5 Upregulation in

- Infraorbital Nerve- versus Sciatic Nerve-Ligated Rat.” *Neuroscience Letters* 653: 113–19. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.05.035>.
- Nakai, Kunihiro, Aya Nakae, Ryota Hashimoto, Takashi Mashimo, and Ko Hosokawa. 2014. “Antinociceptive Effects of Mirtazapine, Pregabalin, and Gabapentin After Chronic Constriction Injury of the Infraorbital Nerve in Rats.” *Journal of Oral & Facial Pain and Headache* 28 (1): 61–67. <https://doi.org/10.11607/jop.1105>.
- Olesen, J., and T. J. Steiner. 2004. “The International Classification of Headache Disorders, 2nd Edn (ICDH-II).” *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 75 (6): 808–11. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2003.031286>.
- Ouyang, Wenjun, Sascha Rutz, Natasha K. Crellin, Patricia A. Valdez, and Sarah G. Hymowitz. 2011. “Regulation and Functions of the IL-10 Family of Cytokines in Inflammation and Disease.” *Annual Review of Immunology* 29 (1): 71–109. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-031210-101312>.
- Parkitny, Luke, and Jarred Younger. 2017. “Reduced Pro-Inflammatory Cytokines after Eight Weeks of Low-Dose Naltrexone for Fibromyalgia.” *Biomedicines* 5 (4): 16. <https://doi.org/10.3390/biomedicines5020016>.
- Patten, Denise K., Bob G. Schultz, and Daniel J. Berlau. 2018. “The Safety and Efficacy of Low-Dose Naltrexone in the Management of Chronic Pain and Inflammation in Multiple Sclerosis, Fibromyalgia, Crohn’s Disease, and Other Chronic Pain Disorders.” *Pharmacotherapy* 38 (3): 382–89. <https://doi.org/10.1002/phar.2086>.
- Pharmacology, Naltrexone. 1975. “And Metabolism : Current Status” 2 (34): 357–63.
- Pineda-Farias, Jorge B., Nadia L. Caram-Salas, Ana B. Salinas-Abarca, Jorge Ocampo, and Vinicio Granados-Soto. 2017. “Ultra-Low Doses of Naltrexone Enhance the Antiallodynic Effect of Pregabalin or Gabapentin in Neuropathic Rats.” *Drug Development Research* 78 (8): 371–80. <https://doi.org/10.1002/ddr.21409>.
- Richard F. Edlich, Kathryne L. Winters, L. D. Britt, William B. Long. 2006. “Trigeminal Neuralgia.” *TRIGEMINAL NEURALGIA 185 Journal of Long-Term Effects of Medical Implants* 16 (2): 185–92.
- Savernini, Átila, Natascha Savernini, Flávio Almeida de Amaral, Thiago Roberto Lima Romero, Igor Dimitri Gama Duarte, and Maria Salete Abreu de Castro. 2012. “Assay of Therapeutic Ultrasound Induced-Antinociception in Experimental Trigeminal Neuropathic Pain.” *Journal of Neuroscience Research* 90 (8): 1639–45. <https://doi.org/10.1002/jnr.23056>.
- Scarabelot, Vanessa L., Carla de Oliveira, Liciane F. Medeiros, Isabel C. de Macedo,

- Stefania G. Cioato, Lauren Naomi S. Adachi, Ana Helena Paz, Andressa de Souza, Wolnei Caumo, and Iraci L.S. Torres. 2019. "Transcranial Direct-Current Stimulation Reduces Nociceptive Behaviour in an Orofacial Pain Model." *Journal of Oral Rehabilitation* 46 (1): 40–50. <https://doi.org/10.1111/joor.12726>.
- Segal, Dan, John K MacDonald, Nilesh Chande, K MacDonald John, and Nilesh Chande. 2014. "Low Dose Naltrexone for Induction of Remission in Crohn's Disease." *Cochrane Database of Systematic Reviews*, no. 2: 10–13. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD010410.pub2>.
- Sessle B., Lavigne G., Lund J., Dubner R. 2010. *Dor Orofacial*.
- Sharav, Rafael Benoliel & Yair. 2010. "Chronic Orofacial Pain." *Curr Pain Headache Rep* 14: 33–40. <https://doi.org/10.1111/odi.12540>.
- Silva, Guilherme D., Patrícia S.S. Lopes, Erich T. Fonoff, and Rosana L. Pagano. 2015. "The Spinal Anti-Inflammatory Mechanism of Motor Cortex Stimulation: Cause of Success and Refractoriness in Neuropathic Pain?" *Journal of Neuroinflammation* 12 (1): 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12974-014-0216-1>.
- Singh, Manish. 2016. "Trigeminal Neuralgia- Etiology," no. April: 396–420. <http://emedicine.medscape.com/article/1145144-overview#a5>.
- Smith, Jill P., Sandra I. Bingaman, Francesca Ruggiero, David T. Mauger, Aparna Mukherjee, Christopher O. McGovern, and Ian S. Zagon. 2011. "Therapy with the Opioid Antagonist Naltrexone Promotes Mucosal Healing in Active Crohn's Disease: A Randomized Placebo-Controlled Trial." *Digestive Diseases and Sciences* 56 (7): 2088–97. <https://doi.org/10.1007/s10620-011-1653-7>.
- Spezia Adachi, Lauren N., Rafael Vercelino, Carla de Oliveira, Vanessa L. Scarabelot, Andressa de Souza, Liciane F. Medeiros, Stefania G. Cioato, Wolnei Caumo, and Iraci L.S. Torres. 2018. "Isoflurane and the Analgesic Effect of Acupuncture and Electroacupuncture in an Animal Model of Neuropathic Pain." *JAMS Journal of Acupuncture and Meridian Studies* 11 (3): 97–106. <https://doi.org/10.1016/j.jams.2018.01.004>.
- Tawfik, Dina Ibrahim, Afaf Sayed Osman, Hedayat Mahmoud Tolba, Aida Khattab, Lubna O. Abdel-Salam, and Mahmoud M. Kamel. 2016a. "Evaluation of Therapeutic Effect of Low Dose Naltrexone in Experimentally-Induced Crohn's Disease in Rats." *Neuropeptides* 59: 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2016.06.003>.
- . 2016b. "Evaluation of Therapeutic Effect of Low Dose Naltrexone in

- Experimentally-Induced Crohn's Disease in Rats." *Neuropeptides* 59: 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2016.06.003>.
- Toljan, Karlo, and Bruce Vrooman. 2018. "Low-Dose Naltrexone (LDN)—Review of Therapeutic Utilization." *Medical Sciences* 6 (4): 82. <https://doi.org/10.3390/medsci6040082>.
- Truini, Andrea, Luis Garcia-Larrea, and Giorgio Cruccu. 2013. "Reappraising Neuropathic Pain in Humans - How Symptoms Help Disclose Mechanisms." *Nature Reviews Neurology* 9 (10): 572–82. <https://doi.org/10.1038/nrneuro.2013.180>.
- Uddin, Olivia, Paige Studlack, Titilola Akintola, Charles Raver, Alberto Castro, Radi Masri, and Asaf Keller. 2018. "Amplified Parabrachial Nucleus Activity in a Rat Model of Trigeminal Neuropathic Pain." *Neurobiology of Pain* 3 (March): 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.ynpai.2018.02.002>.
- Woolf, Alban Latremoliere and Clifford J. 2010. "Central Sensitization: A Generator of Pain Hypersensitivity by Central Neural Plasticity." *Journal of Pain* 10 (9): 895–926. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2009.06.012>.Central.
- Woolf, Clifford J, and I Decosterd. 2000. "Spared Nerve Injury: An Animal Model of Persistent Peripheral Neuropathic Pain." *Pain* 87: 149–58.
- Younger, Jarred, Luke Parkitny, and David McLain. 2014. "The Use of Low-Dose Naltrexone (LDN) as a Novel Anti-Inflammatory Treatment for Chronic Pain." *Clinical Rheumatology* 33 (4): 451–59. <https://doi.org/10.1007/s10067-014-2517-2>.
- Zakrzewska, J M. 2009. "Practice Parameter : The Diagnostic Evaluation and Treatment of Trigeminal Neuralgia ( an Evidence-Based Review )." <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000326598.83183.04>.
- Zakrzewska, Joanna M., and Roddy McMillan. 2011. "Trigeminal Neuralgia: The Diagnosis and Management of This Excruciating and Poorly Understood Facial Pain." *Postgraduate Medical Journal* 87 (1028): 410–16. <https://doi.org/10.1136/pgmj.2009.080473>.
- Zhang, Yue, Dawei Zhu, Jilei Wang, Liangxin Yang, Liecheng Wang, and Yuanyin Wang. 2017. "Expression of Pannexin-1 in the Trigeminal Ganglion after Chronic Constriction Injury of the Infraorbital Nerve in a Rat Model." *NeuroReport*, 1. <https://doi.org/10.1097/wnr.0000000000000958>.
- Zhang, Z., X. Wang, W. Wang, Y.-G. Lu, and Z. Z. Pan. 2013. "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.” *Molecular Pharmacology* 84 (4): 511–20.  
<https://doi.org/10.1124/mol.113.086496>.

Zhong, Jun, Shi Ting Li, Jin Zhu, Hong Xin Guan, Qiu Meng Zhou, Wei Jiao, Ting Ting Ying, Xiao Sheng Yang, Wen Chuang Zhan, and Xu Ming Hua. 2012. “A Clinical Analysis on Microvascular Decompression Surgery in a Series of 3000 Cases.” *Clinical Neurology and Neurosurgery* 114 (7): 846–51.  
<https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2012.01.021>.

## SUBTITLES

**Figure 1:** Experimental design. CCI – ION: chronic constriction of the infraorbital nerve.

**Figure 2.** Effect of low-dose naltrexone on the mechanical hyperalgesia response in an orofacial neuropathic pain model at different timepoints as measured by the facial Von frey test. Data are presented as the mean  $\pm$  S.E.M. (n=59). Sham pain + Vehicle (SV); Sham pain + Carbamazepine (SC); Sham pain + Naltrexone (SN); Pain + Vehicle (PV); Pain + Carbamazepine (PC); Pain + Naltrexone (PN). # Different from control group; \* Different from C, SV, SC and SN groups; @ Different from all other groups (C, SV, SC, SN, PC and PN). GEE: (Wald  $\chi^2= 314,970$ ; 30,  $P < 0.001$ ).

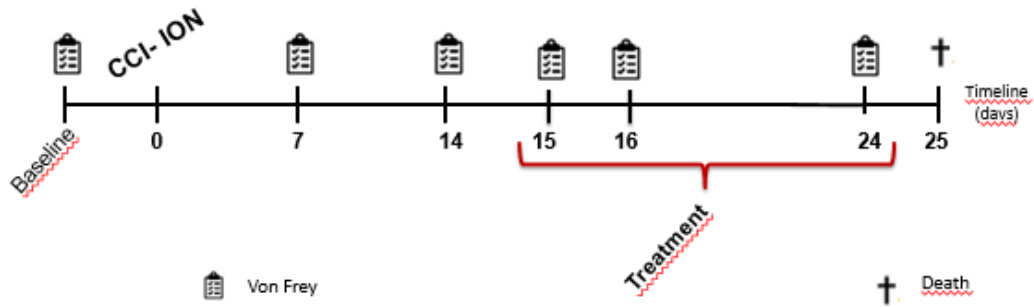
**Figure 3.** BDNF spinal cord levels. Data are presented as the mean  $\pm$  S.E.M. Sham pain + Vehicle (SV); Sham pain + Carbamazepine (SC); Sham pain + Naltrexone (SN); Pain + Vehicle (PV); Pain + Carbamazepine (PC); Pain + Naltrexone (PN)(n=5-6 per groups). There was an interaction between the independent variables: orofacial neuropathic pain and treatment (two-way ANOVA/Bonferroni,  $F_{(2,28)} = 4.914$ ,  $P < 0.05$ ). Control group was removed from two-way ANOVA, because was equal to sham pain + vehicle (Student t test,  $P > 0.05$ ).

**Figure 4.** IL- 10 Spinal cord levels. Data are presented as the mean  $\pm$  S.E.M. Sham pain + Vehicle (SV); Sham pain + Carbamazepine (SC); Sham pain + Naltrexone (SN); Pain + Vehicle (PV); Pain + Carbamazepine (PC); Pain + Naltrexone (PN) (n=5-6 per groups). There was an interaction between orofacial neuropathic pain, and treatment (two-way ANOVA/Bonferroni,  $F_{(2,28)} = 4.495$ ,  $P < 0.05$ ). Control group was removed from two-way ANOVA, because was equal to sham pain + vehicle (Student t test,  $P > 0.05$ ).

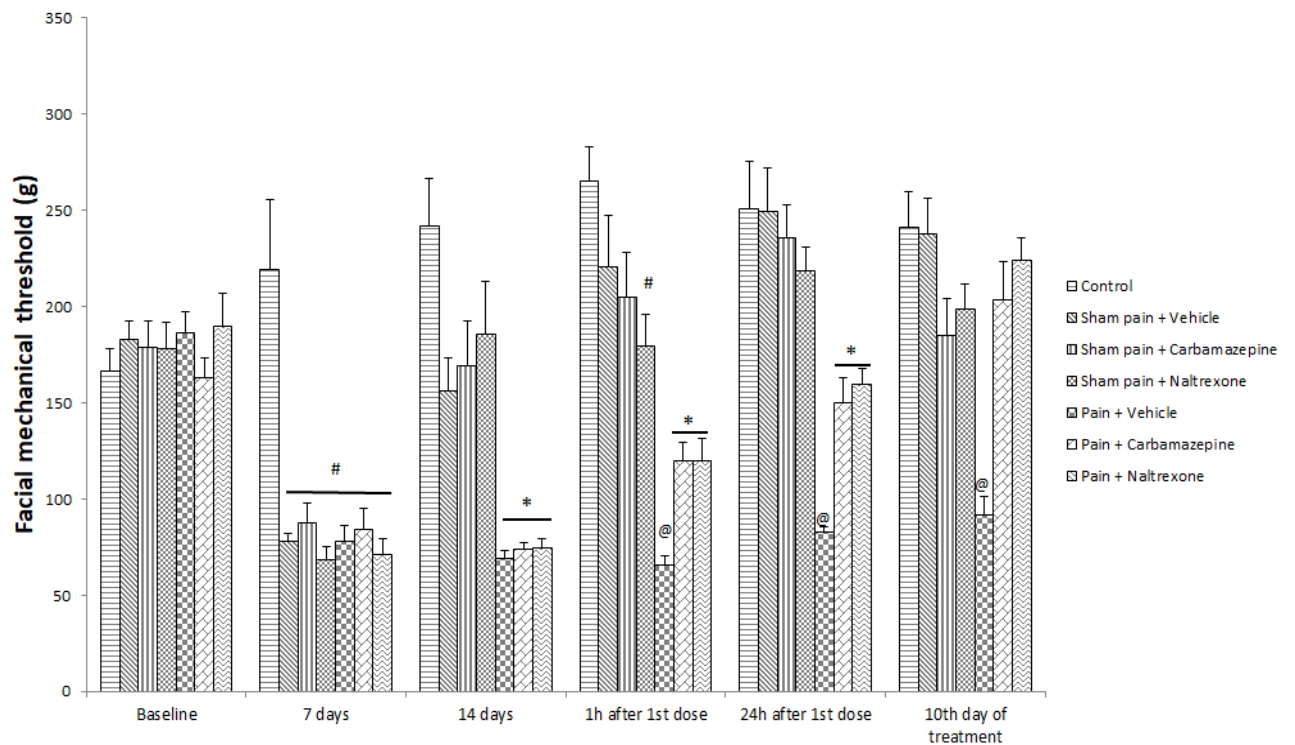
**Table 1.** Brainstem IL- 10, TNF- $\alpha$  and BDNF levels and Spinal cord TNF-  $\alpha$  levels. Data are presented as the mean  $\pm$  S.E.M. There was not an interaction between the independent variables: orofacial neuropathic pain, and treatment (Two-way ANOVA,  $P > 0.05$ ,  $N = 35$ ). Control group was removed from two-way ANOVA, because was equal to sham pain + vehicle (Student t test,  $P > 0.05$ ).

## FIGURES AND TABLES

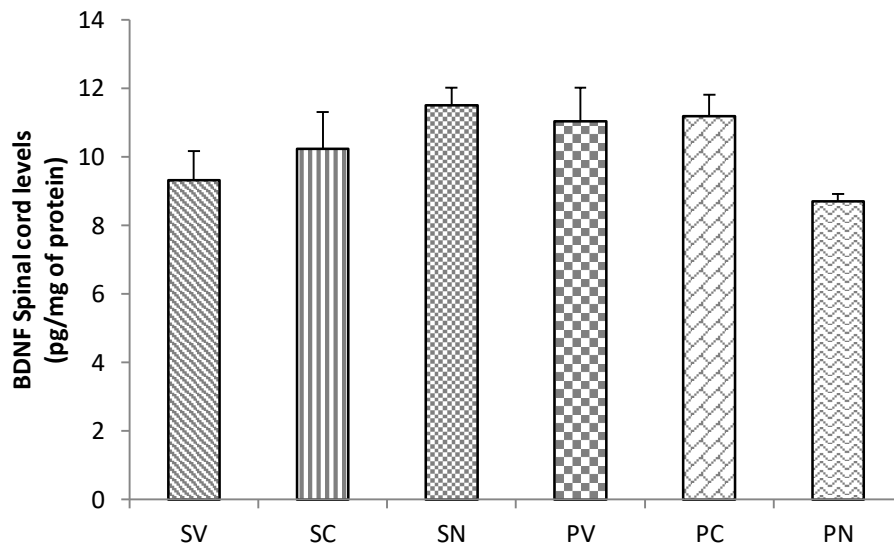
**FIGURE 1**



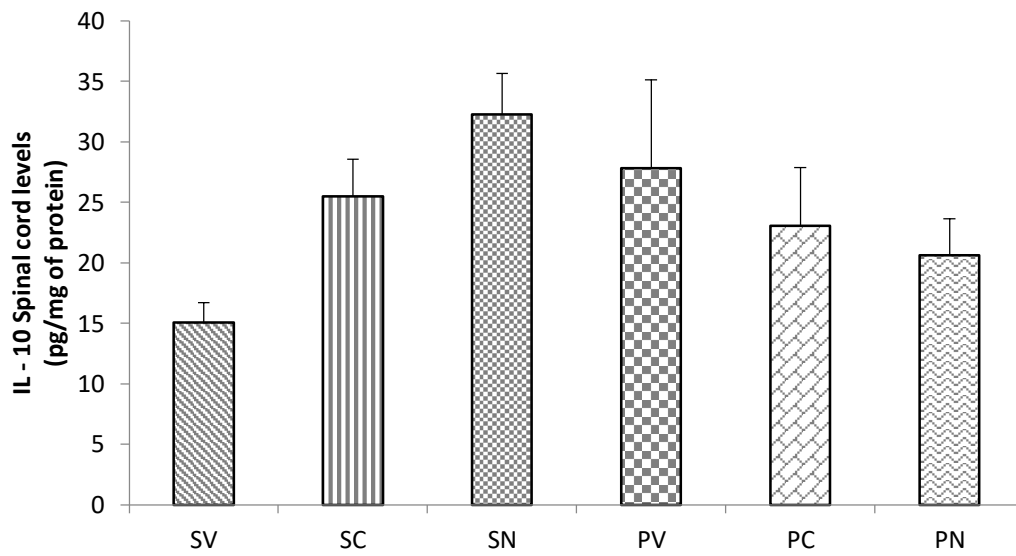
**FIGURE 2**



**FIGURE 3**



**FIGURE 4**



**TABLE 1**

	IL-10 levels		TNF- $\alpha$ levels		BDNF levels
	Brainstem	Spinal Cord	Brainstem	Brainstem	
Sham pain + Vehicle	30.19 $\pm$ 5.00	41.74 $\pm$ 4.74	48.88 $\pm$ 7.52	10.72 $\pm$ 1.42	
Sham pain + Carbamazepine	30.55 $\pm$ 6.18	49.99 $\pm$ 7.86	45.23 $\pm$ 10.64	9.23 $\pm$ 1.71	
Sham pain + Naltrexone	21.69 $\pm$ 3.58	50.42 $\pm$ 6.25	35.43 $\pm$ 6.01	6.75 $\pm$ 0.78	
Pain + Vehicle	23.61 $\pm$ 5.09	43.21 $\pm$ 4.94	41.22 $\pm$ 9.65	8.79 $\pm$ 1.24	
Pain + Carbamazepine	22.07 $\pm$ 5.15	41.06 $\pm$ 8.32	33.85 $\pm$ 7.38	8.55 $\pm$ 1.30	
Pain + Naltrexone	15.99 $\pm$ 1.33	41.70 $\pm$ 4.69	27.66 $\pm$ 1.94	6.51 $\pm$ 0.48	

# **PARTE III**

---

**DISCUSSÃO GERAL**



## 7 DISCUSSÃO GERAL

Considerando dados diversos da literatura sobre a duração do modelo de dor neuropática por constrição crônica do nervo infra-orbitário, neste presente estudo, investigou-se a caracterização de dois fios de sutura no desenvolvimento e manutenção da neuralgia trigeminal em ratos. A partir de resultados prévios do grupo, identificou-se que a utilização do fio vycril funciona perfeitamente para indução de modelo de dor trigeminal em ratos, no entanto a manutenção desta NT perdura por um período relativamente curto o que não permite a investigação de efeitos de tratamentos crônicos para analgesia ou redução da hiperalgisia facial apresentada pelos animais (Callai et al. 2019). Para tanto, a proposta do presente estudo foi avaliar a manutenção da dor neuropática trigeminal por meio de dois fios de sutura diferentes, fios nylon e seda, e para um segundo protocolo, avaliar a analgesia induzida por tratamentos farmacológicos repetidos, sem que ocorra a perda do modelo de dor.

Os resultados do presente estudo, é notório que ao realizar o modelo de NT torna-se indispensável à utilização de um fio de sutura adequado. Essa observação se faz necessária principalmente quando se objetiva o teste de terapias prolongadas. Para mensurar resposta hiperalgésica facial destes animais, utilizou-se o teste de von Frey eletrônico, onde se obtém o limiar hiperalgésico mecânico facial.

Importante ressaltar que 7 dias após a indução da NT, todos os grupos apresentaram redução no limiar mecânico facial, inclusive o *Sham* Dor, caracterizando assim o processo de dor inflamatória no local de realização do procedimento cirúrgico. No entanto, nota-se que o estabelecimento da dor neuropática orofacial ocorre 14 dias após a cirurgia, e se mantém durante 24 dias após a constrição crônica do nervo infra-orbitário, uma vez que apenas os grupos Dor apresentam redução do limiar mecânico facial em relação ao grupo *Sham* Dor. Esse resultado está de acordo com outros achados do nosso grupo, onde se estabeleceu um modelo de dor neuropática por constrição crônica do nervo isquiático (Filho et al. 2016; Spezia Adachi et al. 2018; Cioato et al. 2016), mesmo sendo um local anatomicamente diferente, o padrão temporal de indução de neuropatia apresentou similaridade.

Em relação aos achados do nosso estudo quanto a caracterização do fio de sutura mais adequado para a indução e manutenção do modelo de NT, nossos resultados corroboram com a literatura. Utilizando fio seda para estabelecer o modelo de NT em ratos Sprague–Dawley, M'Dahoma et al. 2018 (M'Dahoma et al. 2018), observaram a

ocorrência de alodinia mecânica na área inervada pelo nervo infraorbitário quando realizada no período de 14 dias pós-cirurgia, por meio do teste de Von Frey filamentos. Demonstrando assim, que o fio seda pode ser utilizado com confiança em avaliações agudas.

Este mesmo fio foi utilizado por Zhang et al. 2017 (Y. Zhang et al. 2017), e a hiperalgesia facial dos ratos foi avaliada durante 7 semanas por meio do teste de von Frey filamentos. O grupo Dor apresentou um limiar de dor significativamente reduzido em relação ao grupo *Sham* dor, que se manteve durante as 7 semanas de avaliação. Sendo assim, a utilização do fio seda é indicado para avaliações de efeitos analgésicos de terapias prolongadas.

Por outro lado, a utilização do fio nylon 4-0 para realização da ligadura no nervo infraorbitário, conforme realizado por Savernini et al. 2012 (Savernini et al. 2012), também apresenta considerável indução e manutenção do modelo de NT em ratos. O limiar térmico dos ratos que receberam ligadura do nervo com fio nylon, foi menor quando comparado ao grupo *Sham Dor*, até o 24º dia pós-cirurgia. Esses resultados caracterizam que o fio nylon é também uma opção para indução de modelo de NT em ratos.

Em suma, o presente estudo destaca a utilização de diferentes fios de sutura, como seda 4-0 e nylon 4-0, para indução de NT em ratos, e principalmente, para manutenção da NT e consequentemente avaliação de efeitos de terapias farmacológicas e não farmacológicas em longo prazo.

Além disso, nossos achados também demonstraram que uma única dose de *low dose naltrexone* (LDN) foi capaz de reverter parcialmente a hiperalgesia mecânica facial induzida pela constrição crônica do nervo infraorbital; resultado semelhante foi encontrado com carbamazepina. Curiosamente, após tratamento repetido com LDN (10 dias), o comportamento hipernociceptivo facial foi totalmente invertido; os grupos de dor que receberam LDN ou carbamazepina mostraram limiar mecânico facial semelhante ao grupo controle. Além disso, descobrimos que o LDN é capaz de modular os níveis de BDNF e da IL-10 na medula espinhal de maneira diferente de acordo com o nível basal, por exemplo, seus níveis aumentaram no grupo *sham*-dor e diminuíram no grupo dor. Como sugerido na literatura, o mecanismo de ação da naltrexona pode ser ligado ao TLR4 (Patten, Schultz, and Berlau 2018), no entanto, em nosso estudo, não foi encontrada diferença significativa nos níveis de TLR4; pelo menos nas estruturas foram medidas.

Nesse contexto, vale ressaltar que uma única dose de LDN parece promover analgesia após a primeira dose. Assim, futuros estudos poderiam investigar também o uso de LDN para dor aguda. Por outro lado, o tratamento repetido com LDN reverteu totalmente o comportamento hipernociceptivo de ratos com NT; corroborando estudos anteriores que mostram evidências do efeito analgésico do LDN nas condições de dor em estudos clínicos (Jarred Younger 2009; Parkitny and Younger 2017; Smith et al. 2011). Dados da literatura mostraram que a co-administração de doses ultra baixas de naltrexona e pregabalina ou gabapentina reduziu a alodinia tátil induzida pela ligação do nervo espinhal e que a naltrexona produziu parte de seu efeito antialodínâmico ou interação sinérgica pela ativação de receptores opióides (Pineda-Farias et al. 2017), especialmente através do bloqueio dos receptores mu-opióides (Patten, Schultz, and Berlau 2018).

E, sabe-se que os medicamentos opióides em ratos foram capazes de induzir a sinalização de TLR4, o que pode levar a efeitos pró-inflamatórios induzidos por opióides (Patten, Schultz, and Berlau 2018). Células gliais, como astrócitos e microglia, estão envolvidas de forma importante na dor neuropática (Linda R. Watkins, Mark R. Hutchinson, Annemarie Ledebøer, Julie Wieseler-Frank, Erin D. Milligan 2007). E LDN é conhecida por atuar como um modulador glial, ligando-se especificamente ao TLR4, agindo como um antagonista (Toljan and Vrooman 2018). Entretanto, nosso estudo não encontrou diferenças nos níveis de TLR4 no tronco encefálico e na medula espinhal nos grupos que receberam LDN. Nosso principal ponto chave relacionado ao efeito analgésico do LDN foi sua interação com o TLR4, porém não conseguimos provar seu envolvimento, pelo menos nas estruturas do SNC que foram analisadas.

Dor crônica é considerada como dor persistente por mais de 3 meses em humanos (Merskey, Harold. Bogduk 2011). O estabelecimento da dor crônica envolve uma cascata de fatores de grande variedade, incluindo o aumento dos níveis de interleucinas pró-inflamatórias, o que pode sensibilizar os nociceptores (Leung and Cahill 2010). Portanto, essas substâncias algogênicas também promovem a sensibilização do SNC, promovendo mudanças na neuromatriz da dor e resposta mal adaptativa (Baron 2006).

Em nosso estudo, embora não significativo, o grupo dor que recebeu LDN apresentou diminuição nos níveis de TNF- $\alpha$ . Assim, esses achados corroboram com a literatura (Callai et al. 2019), que encontrou níveis modificados de interleucinas pró-inflamatórias no modelo de dor no trigêmeo. TNF- $\alpha$  é uma citocina relacionada à patogênese da dor neuropática periférica e central. Em um estudo do modelo de constrição ciática crônica em ratos, o TNF- $\alpha$  foi detectado no local da lesão (Leung and Cahill 2010).

Conseqüentemente, sugerimos que a diminuição dos níveis de TNF- $\alpha$  corroborou o aumento dos limiares de dor observados no teste de Von Frey, mostrando uma diminuição da dor. Uma vez que níveis decrescentes de interleucina pró-inflamatória estão envolvidos nos processos de dor neuropática (Leung and Cahill 2010). Este achado foi confirmado no grupo dor que recebeu tratamento com carbamazepina, o padrão-ouro para tratamento da NT (G. Gronseth, G. Cruccu, J. Alksne, C. Argoff, M. Brainin, K. Burchiel, T. Nurmikko 2008), embora a resposta do grupo dor que recebeu LDN pareça mais robusta.

Os níveis de BDNF foram previamente associados à sensibilidade à dor e têm um papel pronociceptivo bem documentado nos processos de dor inflamatória e neuropática (Z. Zhang et al. 2013). NT também apresenta alterações na homeostase da neurotrofina, estimulando respostas neuroplásticas mal-adaptativas que podem dificultar o tratamento e o tratamento da dor (Scarabelot et al. 2019). Nós observamos uma interação interessante entre dor neuropática orofacial e tratamento, grupo sem dor que recebeu LDN apresentou níveis mais elevados, e grupo dor que recebeu LDN mostrou níveis mais baixos de BDNF na medula espinhal, caracterizando que o estado basal dos animais pode desencadear uma resposta oposta frente a um tratamento. Observamos efeito similar em outro estudo do nosso grupo (Spezia Adachi et al. 2018).

Da mesma forma, observamos uma interação entre dor e tratamento nos níveis de IL-10 na medula espinhal dos ratos, onde ratos sem dor que receberam LDN apresentaram níveis mais altos e o ratos dor que receberam LDN apresentaram níveis mais baixos de IL-10. A interleucina-10 é uma citocina anti-inflamatória liberada em um estágio tardio do processo inflamatório. Tem uma função de proteção; prevenir o dano tecidual excessivo causado pela inflamação (Ouyang et al. 2011; Ira Tabas 2013), e está relacionado à dor neuropática (Junad Khan, Khaled Ramadan, Olga Korczeniewska, Muhammad Moin Anwer, Rafael Benoliela 2015).

---

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

## **8 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Em suma, os resultados desta dissertação demonstram que o protocolo utilizado para induzir o modelo de neuralgia trigeminal em ratos, foi eficaz, uma vez que após 14 dias da indução do modelo os animais apresentaram um quadro de dor crônica neuropática, que foi mantido até final do protocolo experimental. Demonstrando ser um modelo ideal para avaliações de terapias prolongadas. Além disto, demonstramos que uma dose de naltrexona foi capaz de reverter parcialmente a hiperalgesia mecânica facial induzida pela constrição crônica do nervo infraorbital; resultado semelhante foi encontrado com carbamazepina. Adicionalmente, após o 10º dia de tratamento com naltrexona, a hiperalgesia facial foi totalmente revertida, com limiar mecânico facial semelhante ao do grupo controle. Observamos também, que o tratamento repetido com naltrexona modulou os níveis centrais de BDNF e da IL-10 confirmando o papel destes moduladores nos processos de dor. Desta forma, podemos sugerir que baixas doses de naltrexona pode ser uma alternativa terapêutica no tratamento da NT.

---

**PERSPECTIVAS FUTURAS**

## **9 PERSPECTIVAS FUTURAS**

Objetivando enriquecer o conhecimento do mecanismo de ação das baixas doses de naltrexona, são necessários novos experimentos envolvendo a quantificação de TLR4 e BDNF em gânglio trigeminal, uma estrutura intimamente relacionada com a dor orofacial. Além disso, pretendemos desenvolver outros estudos experimentais para avaliar o tratamento com baixas doses de naltrexona em outros contextos de dor crônica. Destarte, desenvolver estudos que abordem mecanismos envolvidos com a atividade antinociceptiva do fármaco em análise.



---

## **REFERÊNCIAS**

## 10 REFERÊNCIAS

- Allsop, Matthew J., Maureen Twiddy, Hilary Grant, Carolyn Czoski-Murray, Mark Mon-Williams, Faisal Mushtaq, Nick Phillips, Joanna M. Zakrzewska, and Sue Pavitt. 2015. “Diagnosis, Medication, and Surgical Management for Patients with Trigeminal Neuralgia: A Qualitative Study.” *Acta Neurochirurgica* 157 (11): 1925–33. <https://doi.org/10.1007/s00701-015-2515-4>.
- Attal, N., G. Cruccu, M. Haanpää, P. Hansson, T. S. Jensen, T. Nurmikko, C. Sampaio, S. Sindrup, and P. Wiffen. 2006. “EFNS Guidelines on Pharmacological Treatment of Neuropathic Pain.” *European Journal of Neurology* 13 (11): 1153–69. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2006.01511.x>.
- Attal, Nadine, Michel Lanteri-Minet, Bernard Laurent, Jacques Fermanian, and Didier Bouhassira. 2011. “The Specific Disease Burden of Neuropathic Pain: Results of a French Nationwide Survey.” *Pain* 152 (12): 2836–43. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2011.09.014>.
- Baron, Ralf. 2006. “Mechanisms of Disease: Neuropathic Pain - A Clinical Perspective.” *Nature Clinical Practice Neurology* 2 (2): 95–106. <https://doi.org/10.1038/ncpneuro0113>.
- Binder, Devin K, and Helen E Scharfman. 2004. “Brain-Derived Neurotrophic Factor.” *Growth Factors (Chur, Switzerland)* 22 (3): 123–31. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2008.05.010>.
- Blom, S. 1962. “Trigeminal Neuralgia: Its Treatment With a New Anticonvulsant Drug (G-32883).” *The Lancet* 279 (7234): 839–40. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(62\)91847-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(62)91847-0).
- Bogduk, Harold Marskey; Nikolai. 1994. “Classification of Chronic Pain- Descriptions of Chronic Pain Syndromes and Definitions of Pain Terms.”
- Bostock, H., M. Campero, J. Serra, and J. L. Ochoa. 2005. “Temperature-Dependent Double Spikes in C-Nociceptors of Neuropathic Pain Patients.” *Brain* 128 (9): 2154–63. <https://doi.org/10.1093/brain/awh552>.
- Bouhassira, Didier, Michel Lantéri-Minet, Nadine Attal, Bernard Laurent, and Chantal Touboul. 2008. “Prevalence of Chronic Pain with Neuropathic Characteristics in the General Population.” *Pain* 136 (3): 380–87. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2007.08.013>.
- Bradford, Marion. 1976. “A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of

- Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding.” *Analytical Biochemistry* 72: 248–54. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- Brietzke, Aline P., Joanna R. Rozisky, Jairo A. Dussan-Sarria, Alicia Deitos, Gabriela Laste, Priscila F.T. Hoppe, Suzana Muller, et al. 2016. “Neuroplastic Effects of Transcranial Direct Current Stimulation on Painful Symptoms Reduction in Chronic Hepatitis C: A Phase II Randomized, Double Blind, Sham Controlled Trial.” *Frontiers in Neuroscience* 9 (JAN): 1–9. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00498>.
- Brown, Norman, and Jaak Panksepp. 2009. “Low-Dose Naltrexone for Disease Prevention and Quality of Life.” *Medical Hypotheses* 72 (3): 333–37. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2008.06.048>.
- Callai, Etiane Micheli Meyer, Vanessa Leal Scarabelot, Liciane Fernandes Medeiros, Carla de Oliveira, Andressa de Souza, Isabel Cristina Macedo, Stefania Giotti Cioato, et al. 2019. “Transcranial Direct Current Stimulation (TDCS) and Trigeminal Pain: A Preclinical Study.” *Oral Diseases* 25 (3): 888–97. <https://doi.org/10.1111/odi.13038>.
- Cheol Moon, Hyeong, Won Ik Heo, Yon Ji Kim, Dae Lee, So Yoon Won, Hong Rae Kim, Seung Man Ha, Youn Joo Lee, and Young Seok Park. 2017. “Optical Inactivation of the Anterior Cingulate Cortex Modulate Descending Pain Pathway in a Rat Model of Trigeminal Neuropathic Pain Created via Chronic Constriction Injury of the Infraorbital Nerve.” *Journal of Pain Research*, 10–2355. <https://doi.org/10.2147/JPR.S138626>.
- Chogtu, Bharti, K L Bairy, D Smitha, Supurna Dhar, and P Himabindu. 2011. “Comparison of the Efficacy of Carbamazepine, Gabapentin and Lamotrigine for Neuropathic Pain in Rats.” *Indian Journal of Pharmacology* 43 (5): 596–98. <https://doi.org/10.4103/0253-7613.84980>.
- Choi, Byung Moon; Lee, Soo Han; An, Sang Mee; Park, Do Yang; Lee, Gwan Woo; Noh, Gyu-Jeong. 2015. “The Time-Course and RNA Pain Induced by L5 Spinal Nerve IL-1 $\beta$  Expression on Neuropathic Interference of TNF- $\alpha$ , IL-6, and Transection in Rats.” *Korean Journal of Anesthesiology* 68 (2): 159–69.
- Cioato, Stefania Giotti, Liciane Fernandes Medeiros, Paulo Ricardo Marques Filho, Rafael Vercelino, Andressa De Souza, Vanessa Leal Scarabelot, Carla De Oliveira, et al. 2016. “Long-Lasting Effect of Transcranial Direct Current Stimulation in the Reversal of Hyperalgesia and Cytokine Alterations Induced by the Neuropathic Pain

- Model.” *Brain Stimulation* 9 (2): 209–17. <https://doi.org/10.1016/j.brs.2015.12.001>.
- Costa, Grazielle Mara Ferreira, and Camila Megale De Almeida Leite. 2015. “Trigeminal Neuralgia: Peripheral and Central Mechanisms.” *Revista Dor* 16 (4): 297–301. <https://doi.org/10.5935/1806-0013.20150061>.
- Cree, Bruce A.C., Elena Kornyeveva, and Douglas S. Goodin. 2010. “Pilot Trial of Low-Dose Naltrexone and Quality of Life in Multiple Sclerosis.” *Annals of Neurology* 68 (2): 145–50. <https://doi.org/10.1002/ana.22006>.
- Cruccu, G., A. Biasiotta, F. Galeotti, G. D. Iannetti, P. Innocenti, A. Romaniello, and A. Truini. 2006. *Chapter 14 Diagnosis of Trigeminal Neuralgia: A New Appraisal Based on Clinical and Neurophysiological Findings. Supplements to Clinical Neurophysiology*. Vol. 58. Elsevier B.V. [https://doi.org/10.1016/S1567-424X\(09\)70067-4](https://doi.org/10.1016/S1567-424X(09)70067-4).
- Cruccu, G., G. Gronseth, J. Alksne, C. Argoff, M. Brainin, K. Burchiel, T. Nurmikko, and J. M. Zakrzewska. 2008. “AAN-EFNS Guidelines on Trigeminal Neuralgia Management.” *European Journal of Neurology* 15 (10): 1013–28. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2008.02185.x>.
- Devor, Marshall, Ron Amir, and Z. Harry Rappaport. 2002. “Pathophysiology of Trigeminal Neuralgia: The Ignition Hypothesis.” *Clinical Journal of Pain* 18 (1): 4–13. <https://doi.org/10.1097/00002508-200201000-00002>.
- Dieleman, Jeanne P., Joost Kerklaan, Frank J P M Huygen, Paul A D Bouma, and Miriam C J M Sturkenboom. 2008. “Incidence Rates and Treatment of Neuropathic Pain Conditions in the General Population.” *Pain* 137 (3): 681–88. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2008.03.002>.
- Filho, Paulo Ricardo Marques, Rafael Vercelino, Stefania Giotti Cioato, Liciane Fernandes Medeiros, Carla de Oliveira, Vanessa Leal Scarabelot, Andressa Souza, et al. 2016. “Transcranial Direct Current Stimulation (TDCS) Reverts Behavioral Alterations and Brainstem BDNF Level Increase Induced by Neuropathic Pain Model: Long-Lasting Effect.” *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 64: 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2015.06.016>.
- Finnerup, N. B., M. Otto, H. J. McQuay, T. S. Jensen, and S. H. Sindrup. 2005. “Algorithm for Neuropathic Pain Treatment: An Evidence Based Proposal.” *Pain* 118 (3): 289–305. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2005.08.013>.
- Fruhstorfer, H., W. Gross, and O. Selbmann. 2001. “Von Frey Hairs: New Materials for a New Design.” *European Journal of Pain* 5 (3): 341–42.

<https://doi.org/10.1053/eujp.2001.0250>.

- G. Gronseth, G. Cruccu, J. Alksne, C. Argoff, M. Brainin, K. Burchiel, T. Nurmikko, J.M. Zakrzewska. 2008. "Practice Parameter: The Diagnostic Evaluation and Treatment of Trigeminal Neuralgia (an Evidence-Based Review): Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the European Federation of Neurological Societies." *Neurology* 71 (15): 1183–90. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000326598.83183.04>.
- Gironi, M., F. Martinelli-Boneschi, P. Sacerdote, C. Solaro, M. Zaffaroni, R. Cavarretta, L. Moiola, et al. 2008. "A Pilot Trial of Low-Dose Naltrexone in Primary Progressive Multiple Sclerosis." *Multiple Sclerosis* 14 (8): 1076–83. <https://doi.org/10.1177/1352458508095828>.
- Hamann, Scott R., Hammad Malik, Jewell W. Sloan, and Elzbeita P. Wala. 2004. "Interactions of 'Ultra-Low' Doses of Naltrexone and Morphine in Mature and Young Male and Female Rats." *Receptors and Channels* 10 (2): 73–81. <https://doi.org/10.1080/10606820490464334>.
- Hanka, Haber. 1996. "Alcohol Induces Formation of Morphine Precursors in the Striatum of Rats" 60 (5).
- Haviv, Y., J. Khan, A. Zini, G. Almoznino, Y. Sharav, and R. Benoliel. 2016. "Trigeminal Neuralgia (Part I): Revisiting the Clinical Phenotype." *Cephalalgia* 36 (8): 730–46. <https://doi.org/10.1177/0333102415611405>.
- Ibrahim, Suzan. 2014. "Trigeminal Neuralgia: Diagnostic Criteria, Clinical Aspects and Treatment Outcomes. A Retrospective Study." *Gerodontology* 31 (2): 89–94. <https://doi.org/10.1111/ger.12011>.
- Imamura, Yoshiki, Hiroya Kawamoto, and Osamu Nakanishi. 1997. "Characterization of Heat-Hyperalgesia in an Experimental Trigeminal Neuropathy in Rats." *Experimental Brain Research* 116 (1): 97–103. <https://doi.org/10.1007/PL00005748>.
- Ira Tabas, Christopher K. Glass. 2013. "Anti-Inflammatory Therapy in Chronic Disease: Challenges and Opportunities." *Science* 11 (6116): 166–72. <https://doi.org/10.1126/science.1230720>. Anti-Inflammatory.
- Jarred Younger, Sean Mackey. 2009. "Fibromyalgia Symptoms Are Reduced by Low-Dose Naltrexone: A Pilot Study." *Pain Med* 10 (4): 663–72. <https://doi.org/10.1111/j.1526-4637.2009.00613.x>. Fibromyalgia.
- Junad Khan, Khaled Ramadan, Olga Korczeniewska, Muhammad Moin Anwer, Rafael

- Benoliela, Eli Eliav. 2015. "Interleukin-10 Levels in Rat Models of Nerve Damage and Neuropathic Pain." *Neuroscience Letters* 592: 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.07.049>.
- Kilkenny, Carol, William J. Browne, Innes C. Cuthill, Michael Emerson, and Douglas G. Altman. 2013. "Improving Bioscience Research Reporting: The Arrive Guidelines for Reporting Animal Research." *Animals* 4 (1): 35–44. <https://doi.org/10.3390/ani4010035>.
- Kirkpatrick, D. B. 1989. "Familial Trigeminal Neuralgia: Case Report." *Neurosurgery* 24 (5): 758–61.
- Kleef, Maarten van; Genderen, Wilco E. van; Narouze, Sem; Nurmikko, Turo J; Zundert, Jan van; Geurts, José W; Mekhail, Nagy. 2009. "Trigeminal Neuralgia." *Pain Practice* 9 (4): 308–11. <https://doi.org/10.1111/j.1533-2500.2009.00288.x>.
- Krafft, Rudolph M. 2008. "Trigeminal Neuralgia." *Am Fam Physician* 77 (9): 1291–96.
- Leclercq, D., J.-B. Thiebaut, and F. Héran. 2013. "Trigeminal Neuralgia." *Diagnostic and Interventional Imaging* 94 (10): 993–1001. <https://doi.org/10.1016/j.diii.2013.08.002>.
- Lee, John Y. K., John T. Pierce, Sukhmeet K. Sandhu, Dmitriy Petrov, and Andrew I. Yang. 2016. "Endoscopic versus Microscopic Microvascular Decompression for Trigeminal Neuralgia: Equivalent Pain Outcomes with Possibly Decreased Postoperative Headache after Endoscopic Surgery." *Journal of Neurosurgery* 126 (5): 1676–84. <https://doi.org/10.3171/2016.5.jns1621>.
- Leung, Lawrence, and Catherine M Cahill. 2010. "TNF-Alpha and Neuropathic Pain--a Review." *Journal of Neuroinflammation* 7 (Cci): 27. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-7-27>.
- Li, K. W., D. S. Kim, F. Zaucke, and Z. D. Luo. 2014. "Trigeminal Nerve Injury-Induced Thrombospondin-4 up-Regulation Contributes to Orofacial Neuropathic Pain States in a Rat Model." *European Journal of Pain (United Kingdom)* 18 (4): 489–95. <https://doi.org/10.1002/j.1532-2149.2013.00396.x>.
- Li, Kang Wu, Yanhui Peter Yu, Chunyi Zhou, Doo Sik Kim, Bin Lin, Kelli Sharp, Oswald Steward, and Z. David Luo. 2014. "Calcium Channel A2δ1 Proteins Mediate Trigeminal Neuropathic Pain States Associated with Aberrant Excitatory Synaptogenesis." *Journal of Biological Chemistry* 289 (10): 7025–37. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.548990>.
- Li, Zijian, Yue You, Noreen Griffin, Juan Feng, and Fengping Shan. 2018. "Low-Dose

- Naltrexone (LDN): A Promising Treatment in Immune-Related Diseases and Cancer Therapy.” *International Immunopharmacology* 61 (36): 178–84. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.05.020>.
- Linda R. Watkins, Mark R. Hutchinson, Annemarie Ledebøer, Julie Wieseler-Frank, Erin D. Milligan, and Steven F. Maier. 2007. “Glia as the ‘Bad Guys’: Implications for Improving Clinical Pain Control and the Clinical Utility of Opioids.” *Brain Behav Immun.* 21 (2): 131–46. <https://doi.org/doi:10.1016/j.bbi.2006.10.011>.
- Love, S, and H B Coakham. 2001. “Trigeminal Neuralgia: Pathology and Pathogenesis.” *Brain: A Journal of Neurology* 124 (Pt 12): 2347–60. <https://doi.org/10.1093/brain/124.12.2347>.
- Luiz, A. P., S. D. Schroeder, G. A. Rae, J. B. Calixto, and J. G. Chichorro. 2015. “Contribution and Interaction of Kinin Receptors and Dynorphin A in a Model of Trigeminal Neuropathic Pain in Mice.” *Neuroscience* 300: 189–200. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.05.015>.
- M’Dahoma, Saïd, Matthieu Poitevin, Eric Dabala, Hugo Payan, Cecilia Gabriel, Elisabeth Mocaër, Sylvie Bourgoïn, and Michel Hamon. 2018. “A 2 - and B 2 - Adrenoreceptor-Mediated Efficacy of the Atypical Antidepressant Agomelatine Combined With Gabapentin To Suppress Allodynia in Neuropathic Rats With Ligated Infraorbital or Sciatic Nerve.” *Frontiers in Pharmacology* 9 (JUN): 1–17. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00587>.
- Maarbjerg, Stine, Aydin Gozalov, Jes Olesen, and Lars Bendtsen. 2014. “Trigeminal Neuralgia-a Prospective Systematic Study of Clinical Characteristics in 158 Patients.” *Headache* 54 (10): 1574–82. <https://doi.org/10.1111/head.12441>.
- Maarbjerg, Stine, Giulia Di Stefano, Lars Bendtsen, and Giorgio Cruccu. 2017. “Trigeminal Neuralgia - Diagnosis and Treatment.” *Cephalalgia* 37 (7): 648–57. <https://doi.org/10.1177/0333102416687280>.
- McLaughlin, Mark R., Peter J. Jannetta, Brent L. Clyde, Brian R. Subach, Christopher H. Comey, and Daniel K. Resnick. 1999. “Microvascular Decompression of Cranial Nerves: Lessons Learned after 4400 Operations.” *Journal of Neurosurgery* 90 (1): 1–8. <https://doi.org/10.3171/jns.1999.90.1.0001>.
- Merskey, Harold. Bogduk, Nikolai. 2011. “Classification of Chronic Pain.” *IASP PRESS*, 222.
- Michot, Benoit, Ronald Deumens, and Emmanuel Hermans. 2017. “Immunohistochemical Comparison of Astrocytic MGluR5 Upregulation in

- Infraorbital Nerve- versus Sciatic Nerve-Ligated Rat.” *Neuroscience Letters* 653: 113–19. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.05.035>.
- Nakai, Kunihiro, Aya Nakae, Ryota Hashimoto, Takashi Mashimo, and Ko Hosokawa. 2014. “Antinociceptive Effects of Mirtazapine, Pregabalin, and Gabapentin After Chronic Constriction Injury of the Infraorbital Nerve in Rats.” *Journal of Oral & Facial Pain and Headache* 28 (1): 61–67. <https://doi.org/10.11607/jop.1105>.
- Olesen, J., and T. J. Steiner. 2004. “The International Classification of Headache Disorders, 2nd Edn (ICDH-II).” *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 75 (6): 808–11. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2003.031286>.
- Ouyang, Wenjun, Sascha Rutz, Natasha K. Crellin, Patricia A. Valdez, and Sarah G. Hymowitz. 2011. “Regulation and Functions of the IL-10 Family of Cytokines in Inflammation and Disease.” *Annual Review of Immunology* 29 (1): 71–109. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-031210-101312>.
- Parkitny, Luke, and Jarred Younger. 2017. “Reduced Pro-Inflammatory Cytokines after Eight Weeks of Low-Dose Naltrexone for Fibromyalgia.” *Biomedicines* 5 (4): 16. <https://doi.org/10.3390/biomedicines5020016>.
- Patten, Denise K., Bob G. Schultz, and Daniel J. Berlau. 2018. “The Safety and Efficacy of Low-Dose Naltrexone in the Management of Chronic Pain and Inflammation in Multiple Sclerosis, Fibromyalgia, Crohn’s Disease, and Other Chronic Pain Disorders.” *Pharmacotherapy* 38 (3): 382–89. <https://doi.org/10.1002/phar.2086>.
- Pharmacology, Naltrexone. 1975. “And Metabolism : Current Status” 2 (34): 357–63.
- Pineda-Farias, Jorge B., Nadia L. Caram-Salas, Ana B. Salinas-Abarca, Jorge Ocampo, and Vinicio Granados-Soto. 2017. “Ultra-Low Doses of Naltrexone Enhance the Antiallodynic Effect of Pregabalin or Gabapentin in Neuropathic Rats.” *Drug Development Research* 78 (8): 371–80. <https://doi.org/10.1002/ddr.21409>.
- Richard F. Edlich, Kathyryne L. Winters, L. D. Britt, William B. Long. 2006. “Trigeminal Neuralgia.” *TRIGEMINAL NEURALGIA 185 Journal of Long-Term Effects of Medical Implants* 16 (2): 185–92.
- Savernini, Átila, Natascha Savernini, Flávio Almeida de Amaral, Thiago Roberto Lima Romero, Igor Dimitri Gama Duarte, and Maria Salete Abreu de Castro. 2012. “Assay of Therapeutic Ultrasound Induced-Antinociception in Experimental Trigeminal Neuropathic Pain.” *Journal of Neuroscience Research* 90 (8): 1639–45. <https://doi.org/10.1002/jnr.23056>.
- Scarabelot, Vanessa L., Carla de Oliveira, Liciane F. Medeiros, Isabel C. de Macedo,



- Stefania G. Cioato, Lauren Naomi S. Adachi, Ana Helena Paz, Andressa de Souza, Wolnei Caumo, and Iraci L.S. Torres. 2019. "Transcranial Direct-Current Stimulation Reduces Nociceptive Behaviour in an Orofacial Pain Model." *Journal of Oral Rehabilitation* 46 (1): 40–50. <https://doi.org/10.1111/joor.12726>.
- Segal, Dan, John K MacDonald, Nilesh Chande, K MacDonald John, and Nilesh Chande. 2014. "Low Dose Naltrexone for Induction of Remission in Crohn's Disease." *Cochrane Database of Systematic Reviews*, no. 2: 10–13. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD010410.pub2>.
- Sessle B., Lavigne G., Lund J., Dubner R. 2010. *Dor Orofacial*.
- Sharav, Rafael Benoliel & Yair. 2010. "Chronic Orofacial Pain." *Curr Pain Headache Rep* 14: 33–40. <https://doi.org/10.1111/odi.12540>.
- Silva, Guilherme D., Patrícia S.S. Lopes, Erich T. Fonoff, and Rosana L. Pagano. 2015. "The Spinal Anti-Inflammatory Mechanism of Motor Cortex Stimulation: Cause of Success and Refractoriness in Neuropathic Pain?" *Journal of Neuroinflammation* 12 (1): 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12974-014-0216-1>.
- Singh, Manish. 2016. "Trigeminal Neuralgia- Etiology," no. April: 396–420. <http://emedicine.medscape.com/article/1145144-overview#a5>.
- Smith, Jill P., Sandra I. Bingaman, Francesca Ruggiero, David T. Mauger, Aparna Mukherjee, Christopher O. McGovern, and Ian S. Zagon. 2011. "Therapy with the Opioid Antagonist Naltrexone Promotes Mucosal Healing in Active Crohn's Disease: A Randomized Placebo-Controlled Trial." *Digestive Diseases and Sciences* 56 (7): 2088–97. <https://doi.org/10.1007/s10620-011-1653-7>.
- Spezia Adachi, Lauren N., Rafael Vercelino, Carla de Oliveira, Vanessa L. Scarabelot, Andressa de Souza, Liciane F. Medeiros, Stefania G. Cioato, Wolnei Caumo, and Iraci L.S. Torres. 2018. "Isoflurane and the Analgesic Effect of Acupuncture and Electroacupuncture in an Animal Model of Neuropathic Pain." *JAMS Journal of Acupuncture and Meridian Studies* 11 (3): 97–106. <https://doi.org/10.1016/j.jams.2018.01.004>.
- Tawfik, Dina Ibrahim, Afaf Sayed Osman, Hedayat Mahmoud Tolba, Aida Khattab, Lubna O. Abdel-Salam, and Mahmoud M. Kamel. 2016a. "Evaluation of Therapeutic Effect of Low Dose Naltrexone in Experimentally-Induced Crohn's Disease in Rats." *Neuropeptides* 59: 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2016.06.003>.
- . 2016b. "Evaluation of Therapeutic Effect of Low Dose Naltrexone in

- Experimentally-Induced Crohn's Disease in Rats." *Neuropeptides* 59: 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2016.06.003>.
- Toljan, Karlo, and Bruce Vrooman. 2018. "Low-Dose Naltrexone (LDN)—Review of Therapeutic Utilization." *Medical Sciences* 6 (4): 82. <https://doi.org/10.3390/medsci6040082>.
- Truini, Andrea, Luis Garcia-Larrea, and Giorgio Cruccu. 2013. "Reappraising Neuropathic Pain in Humans - How Symptoms Help Disclose Mechanisms." *Nature Reviews Neurology* 9 (10): 572–82. <https://doi.org/10.1038/nrneuro.2013.180>.
- Uddin, Olivia, Paige Studlack, Titilola Akintola, Charles Raver, Alberto Castro, Radi Masri, and Asaf Keller. 2018. "Amplified Parabrachial Nucleus Activity in a Rat Model of Trigeminal Neuropathic Pain." *Neurobiology of Pain* 3 (March): 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.ynpai.2018.02.002>.
- Woolf, Alban Latremoliere and Clifford J. 2010. "Central Sensitization: A Generator of Pain Hypersensitivity by Central Neural Plasticity." *Journal of Pain* 10 (9): 895–926. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2009.06.012>.Central.
- Woolf, Clifford J, and I Decosterd. 2000. "Spared Nerve Injury: An Animal Model of Persistent Peripheral Neuropathic Pain." *Pain* 87: 149–58.
- Younger, Jarred, Luke Parkitny, and David McLain. 2014. "The Use of Low-Dose Naltrexone (LDN) as a Novel Anti-Inflammatory Treatment for Chronic Pain." *Clinical Rheumatology* 33 (4): 451–59. <https://doi.org/10.1007/s10067-014-2517-2>.
- Zakrzewska, J M. 2009. "Practice Parameter : The Diagnostic Evaluation and Treatment of Trigeminal Neuralgia ( an Evidence-Based Review )." <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000326598.83183.04>.
- Zakrzewska, Joanna M., and Roddy McMillan. 2011. "Trigeminal Neuralgia: The Diagnosis and Management of This Excruciating and Poorly Understood Facial Pain." *Postgraduate Medical Journal* 87 (1028): 410–16. <https://doi.org/10.1136/pgmj.2009.080473>.
- Zhang, Yue, Dawei Zhu, Jilei Wang, Liangxin Yang, Liecheng Wang, and Yuanyin Wang. 2017. "Expression of Pannexin-1 in the Trigeminal Ganglion after Chronic Constriction Injury of the Infraorbital Nerve in a Rat Model." *NeuroReport*, 1. <https://doi.org/10.1097/wnr.0000000000000958>.
- Zhang, Z., X. Wang, W. Wang, Y.-G. Lu, and Z. Z. Pan. 2013. "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.” *Molecular Pharmacology* 84 (4): 511–20.  
<https://doi.org/10.1124/mol.113.086496>.

Zhong, Jun, Shi Ting Li, Jin Zhu, Hong Xin Guan, Qiu Meng Zhou, Wei Jiao, Ting Ting Ying, Xiao Sheng Yang, Wen Chuang Zhan, and Xu Ming Hua. 2012. “A Clinical Analysis on Microvascular Decompression Surgery in a Series of 3000 Cases.” *Clinical Neurology and Neurosurgery* 114 (7): 846–51.  
<https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2012.01.021>.

---

**APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

## 11 APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE

Grupo de Pesquisa e Pós Graduação

### Carta de Aprovação

Certificamos que o projeto abaixo, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) e pelas áreas de apoio indicadas pelo pesquisador.

Projeto: 2017/0575

Título: BAIXAS DOSES DE MALTREXONA EM MODELO DE DOR NEUROPÁTICA TRIGEMINAL EM RATOS

Pesquisador Responsável: IRACI LUCENA DA SILVA TORRES

Equipe de Pesquisa:

CAMILA LINO DE OLIVEIRA

ANDRESSA DE SOUZA

Data de Aprovação:

Data de Término: 20/12/2019

Espécie/Linhagem	Sexo/idade	Quantidade
RATO HETEROGÊNICO	M55 Dia(s)	113

- Os membros da CEUA/HCPA não participaram do processo de avaliação 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.

---

**PRODUÇÃO ACADÊMICA DURANTE O MESTRADO**

## 12 PRODUÇÃO ACADÊMICA DURANTE O MESTRADO

**Oliveira, C.L;** Souza, V.S; Dussan-Sarria, J.A; Caumo, W; Torres, I.L.S; Souza A. Modelo animal de fibromialgia: resultados parciais. In: V Congresso Sul-Brasileiro de Dor e I Congresso Gaúcho de Cuidados Paliativos, 2018, Porto Alegre.

**Oliveira, C.L;** Regner, G.G; Torres, I.L.S; Plugger, P; Oliveira, C; Scarabelot, V.L; Bellaver, B; Santos, A.Q; Picada, J.N; Pereira, P. Estimulação transcraniana por corrente contínua catodal (ETCC-C) não altera parâmetros de estresse oxidativo em ratos submetidos ao modelo de kindling. In: II Simpósio Gaúcho de Farmacologia, 2018, Porto Alegre.

**Oliveira, C.L;** Souza, V.S; Dussan-Sarria, J.A; Caumo, W; Torres, I.L.S; Souza A. Modelo animal de fibromialgia através da reserpina. In: 38ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2018, Porto Alegre.

Souza, V.S; **Oliveira, C.L;** Dussan-Sarria, J.A; Caumo, W; Torres, I.L.S; Souza A. Fibromialgia através da reserpina: um modelo animal. In: In: II Simpósio Gaúcho de Farmacologia, 2018, Porto Alegre.

LOPES, B.C.; CIOATO, S. G. ; SOUZA, V. ; **OLIVEIRA, C. L. ;** MARQUES, L. X. ; MEDEIROS, L. F. ; FREGNI, F. ; CAUMO, W. ; TORRES, I. L. S. . Long-term effects of combined treatment of physical exercise and transcranial direct current stimulation (tDCS) upon mechanical hyperalgesia in rats. In: X Simpósio Internacional em Neuromodulação, 2018, São Paulo-SP. X Simpósio Internacional em Neuromodulação, 2018.