



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

ERIK WILLYAME MENEZES PEREIRA

**LIMONENO COMPLEXADO ATENUA A NOCICEPÇÃO OROFACIAL COM
PARTICIPAÇÃO DAS VIAS PKA E PKC.**

**ARACAJU - SE
2021**

ERIK WILLYAME MENEZES PEREIRA

**LIMONENO COMPLEXADO ATENUA A NOCICEPÇÃO OROFACIAL COM
PARTICIPAÇÃO DAS VIAS PKA E PKC.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências da Saúde da Universidade Federal de
Sergipe como requisito para a obtenção do título de
Mestre em Ciências da Saúde.

ORIENTADORA: Prof. Dra. Jullyana de Souza Siqueira Quintans

**ARACAJU - SE
2021**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA BISAU
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

P436l Pereira, Erik Willyame Menezes
Limoneno complexado atenua a nocicepção orofacial com participação das vias PKA E PKC / Erik Willyame Menezes Pereira ; orientadora Jullyana de Souza Siqueira Quintans. – Aracaju, 2021.
61 f. : il.

Dissertação (mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Sergipe, 2021.

1. Dor orofacial. 2. Monoterpenos. 3. Limoneno. 4. Hidroxipropil-beta-Ciclodextrina. I. Quintans, Jullyana de Souza Siqueira, orient. II. Título.

CDU 616.314-009.7

ERIK WILLYAME MENEZES PEREIRA

**LIMONENO COMPLEXADO ATENUA A NOCICEPÇÃO OROFACIAL COM
PARTICIPAÇÃO DAS VIAS PKA E PKC.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências da Saúde da Universidade Federal de
Sergipe como requisito para a obtenção do título de
Mestre em Ciências da Saúde.

Aprovada em: __/__/____

Orientador: Prof. Dr. Jullyana de Souza Siqueira Quintans

Examinador Externo:

Examinador Externo:

Examinador Interno:

PARECER

Resumo

Introdução: A dor orofacial crônica é um sério problema de saúde pública com prevalência de 7-11% na população. Esse transtorno apresenta diferentes etiologias e características que dificultam o tratamento farmacológico. Os produtos naturais têm se mostrado uma fonte promissora de tratamentos para o manejo da dor crônica, a exemplo dos terpenos. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos antinociceptivos e antiinflamatórios de um desses terpenos, o d-limoneno (LIM - um monoterpreno comum encontrado em frutas cítricas) isolado e complexado com hidroxipropil- β -ciclodextrina (LIM/HP β CD) em modelos animais pré-clínicos. **Métodos:** A dor orofacial foi induzida pela administração de solução salina hipertônica na superfície da córnea do olho direito, injeção de formalina na articulação temporomandibular (ATM) ou lesão por constrição crônica do nervo infraorbital (CCI-IoN). O estudo utilizou ratos *wistar* machos (230 – 250 g) e camundongos *swiss* machos (30 – 35 g) tratados com LIM (50 mg/kg, v.o.), LIM/HP β CD (50 mg/kg, v.o.), veículo (água + tween 80, 10 mg/kg, v.o), gabapentina (100 mg/kg, v.o.) ou morfina (10 mg/kg, i.p) e limpeza dos olhos (induzida por solução salina hipertônica), esfregaço facial (induzida por formalina na ATM) ou hiperalgesia mecânica (provocada por CCI-IoN) foram avaliados. Além disso, ELISA foi usado para medir TNF- α e análise de Western blot para avaliar os níveis de PKA α , NF κ B, p38MAPK e substratos de PKC fosforilados. Os níveis séricos de aspartato aminotransferase (AST) e alanina transferase (ALT) também foram avaliados. **Resultados:** LIM e LIM/HP β CD reduziram significativamente ($p < 0,001$) a nocicepção corneal e a nocicepção da ATM induzida por formalina. Além disso, ambas as substâncias atenuaram ($p < 0,001$) a hiperalgesia mecânica no modelo CCI-IoN. O efeito antinociceptivo induzido por LIM e HP β CD/LIM foi associado à diminuição dos níveis de TNF- α , regulação negativa das vias de sinalização de NF κ B e p38MAPK e redução da fosforilação do substrato de PKC e imunocontéudo de PKA. Além disso, os resultados demonstraram que a complexação com HP β CD foi capaz de diminuir a dose terapêutica de LIM. **Conclusões:** O LIM mostrou-se uma molécula promissora para o tratamento da dor orofacial devido à sua capacidade de modular alguns mediadores importantes para o estabelecimento da dor, e o HP β CD pode ser uma ferramenta fundamental para melhorar o perfil do LIM.

Palavras-chave: Dor orofacial crônica, monoterpreno, limoneno, hidroxipropil- β -ciclodextrina.

Abstract

Background: Chronic orofacial pain is a serious public health problem with a prevalence of 7-11% in the population. This disorder has different etiologies and characteristics that make pharmacological treatment difficult. Natural products have been shown to be a promising source of treatments for the management of chronic pain, as an example the terpenes. The aim of this study was to evaluate the anti-nociceptive and anti-inflammatory effects of one of these terpenes, d-limonene (LIM - a common monoterpene found in citrus fruits) alone and complexed with hydroxypropyl- β -cyclodextrin (LIM/HP β CD) in preclinical animal models. **Methods:** Orofacial pain was induced by the administration of hypertonic saline on the corneal surface, the injection of formalin into the temporomandibular joint (TMJ), or chronic constriction injury of the infraorbital nerve (CCI-IoN). The study used male *Wistar* rats and *Swiss* mice treated with LIM (50 mg/kg), LIM/HP β CD (50 mg/kg), vehicle (control), gabapentin or morphine, and eyes wiping (induced by hypertonic saline), face rubbing (formalin-induced in TMJ) or mechanical hyperalgesia (provoked by CCI-IoN) were assessed. Additionally, ELISA was used to measure TNF- α , and western blot analysis to assess levels of PKA α , NF κ B, p38MAPK and phosphorylated PKC substrates. Serum levels of aspartate aminotransferase (AST) and alanine transferase (ALT) were also evaluated. **Results:** LIM and LIM/HP β CD significantly reduced ($p < 0.001$) corneal nociception and formalin-induced TMJ nociception. In addition, both substances attenuated ($p < 0.001$) mechanical hyperalgesia in the CCI-IoN model. The antinociceptive effect induced by LIM and HP β CD/LIM was associated with decreased TNF- α levels, downregulation of the NF κ B and p38MAPK signalling pathways and reduced PKC substrate phosphorylation and PKA immunocontent. Moreover, the results demonstrated that complexation with HP β CD was able to decrease the therapeutic dose of LIM. **Conclusions:** LIM was found to be a promising molecule for the treatment of orofacial pain due to its capacity to modulate some important mediators essential to the establishment of pain, and HP β CD can be a key tool to improve the profile of LIM.

Key words: Chronic orofacial pain, monoterpene, limonene, hydroxypropyl- β -cyclodextrin.

Lista de Abreviaturas

(ATM) – Articulação temporomandibular

(TNF- α) – Fator de necrose tumoral alfa

(IL-1 β) - Interleucina 1 beta

(PKA) – Proteína quinase A

(PKC) – Proteína quinase C

(MAPKs) – Mitógeno ativado por proteína quinase

(NF κ B) – Fator nuclear kappa B

(NSAIDs) – Anti-inflamatório não-esteroidal

(LIM) - D-limoneno

(CDs) - Ciclodextrina

(HP β CD) - Hydroxypropil- β -cyclodextrina

(NaCl) – Cloreto de Sódio

(IoN) – Nervo Infraorbital

(CCI-IoN) – Constricção crônica do nervo infraorbital

(AST) – Aminotransferase aspartato

(ALT) – Transferase alanina

(PBS) - Phosphate-buffered saline

(EDTA) - Ácido etilenodiaminotetracético

(ELISA) - Ensaio imunoenzimático

(pg) - Picograma

(mg) - Miligrama

(BSA) - Albumina sérica bovina

(T-TBS) - Tris-Buffered Saline

(CRTL) – Gupo tratado com veículo

(MOR) - Morfina

(TRPA1) - Canal catiônico potencial do receptor transitório, subfamília A, membro 1

(TRPV1) - Canal catiônico potencial do receptor transitório, subfamília V, membro 1

(GABA) - Gabapentina

Sumário

1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	12
3. OBJETIVOS	17
3.1 Objetivo Geral.....	17
3.2 Objetivo Específico	17
DESENVOLVIMENTO	18
4.1 MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1.1 Animais	19
4.1.2 Preparo do complex de inclusão LIM/HP β CD.....	19
4.1.3 Nocicepção corneal induzida por salina hipertônica (5M).....	19
4.1.4 Nocicepção Temporomandibular Induzida por Formalina.....	20
4.1.5 Docking.....	20
4.1.6 Neuropatia do Trigêmeo – Constrição do Nervo Infraorbital (IoN)	20
4.1.7 Procedimento Cirúrgico	20
4.1.8 Avaliação da hiperalgesia mecânica.....	21
4.1.9 Determinação de AST e ALT.....	21
4.1.10 Determinação dos níveis de TNF- α	22
4.1.11 Western Blot para NF κ B, p38MAPK, PKA α e substrates de PKC fosforilados.....	22
4.1.12 Determinação de proteína.....	23
4.1.13 Análise estatística.....	23
4.2 RESULTADOS.....	24
4.3 DISCUSSÃO.....	33
5 CONCLUSÃO	41
6. REFERÊNCIAS	43

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Distúrbios de dor orofacial são condições que envolvem a cabeça, face, estruturas orais e pescoço, representando um desafio para o clínico, devido a complexidade e quantidade de estruturas envolvidas e as possíveis fontes de dor. (Romero-Reyes and Uyanik, 2014a). Estudos de vários países estimam que entre 20-35% da população apresenta pelo menos um sintoma doloroso na região orofacial, principalmente na articulação temporomandibular. (ATM) (Gonçalves et al., 2009; Hargreaves, 2011; Lipton et al., 1993; Macfarlane et al., 2002; Worsley et al., 2016).

A dor orofacial é geralmente classificada em três áreas: muscularesquelética, neuropática e neurovascular (Okeson, 2008). Em muitos casos, essas condições podem desencadear transtornos psicossociais e comportamentais, como a depressão, com impacto na qualidade de vida e redução da jornada de trabalho (Conti et al., 2012). Além disso, a fisiopatologia da dor orofacial está relacionada com a modulação de mediadores inflamatórios como $\text{TNF-}\alpha$ and $\text{IL-1}\beta$ (Cho et al., 2016; Liu et al., 2019) que se ligam a receptores e ativam vias de sinalização, incluindo proteínas quinases A (PKA) e C (PKC), proteínas quinases ativadas por mitogênio (MAPKs) e fatores nucleares kappa B (NF κ B) (Cao et al., 2013; W. Q. Cui et al., 2019; L. Koop et al., 2017).

Devido a complexidade da doença, seu tratamento costuma envolver o uso de várias classes de medicamentos de longa ou curta duração, como anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), corticosteroides, anticonvulsivantes, analgésicos opioides, antidepressivos tricíclicos e inibidores da recaptação de serotonina e noradrenalina (Häggman-Henrikson et al., 2017; Kulich et al., 2016; Martin et al., 2012; Martin and Forouzanfar, 2011). No entanto, as etiologias e características dos distúrbios são diversas, dificultando o tratamento farmacológico e, muitas vezes, resultando em apenas um alívio parcial da dor e efeitos adversos a medicamentos difíceis de suportar. Portanto, é necessário descobrir novos medicamentos com maior eficácia, segurança e eficiência para o tratamento dos sintomas da dor orofacial (Badel et al., 2019; Clark et al., 2016; Hersh et al., 2008; Sarlani et al., 2005; Sommer, 2002). O reposicionamento de medicamentos tem sido uma das abordagens mais utilizadas, mas permanece uma lacuna que precisa ser preenchida com novos medicamentos com mecanismos farmacológicos mais adequados, incluindo aqueles derivados de produtos naturais (Araújo-Filho et al., 2018; de Oliveira et al., 2020; Siqueira-Lima et al., 2017)

Os produtos naturais estão ganhando destaque no tratamento de condições que envolvem dor e inflamação (Guimarães et al., 2013; Quintans et al., 2019). Em particular, d-limoneno

(LIM), um monoterpene monocíclico presente em várias plantas, e especialmente em óleos essenciais extraídos da casca de frutas cítricas, como limões e laranjas. LIM demonstrou ter propriedades gastroprotetoras, antiarrítmicas, antiinflamatórias e analgésicas (Araújo do Nascimento et al., 2019; Araújo-Filho et al., 2017a; Vieira et al., 2018), e uma substância interessante com potencial para estudo a respeito da redução da dor orofacial. No entanto, LIM é hidrofóbico e suscetível à degradação oxidativa, prejudicando sua aplicabilidade farmacêutica (Li and Chiang, 2012).

Assim, a incorporação em ciclodextrinas (CDs) por meio de complexação tem sido utilizada com o objetivo de melhorar as características físico-químicas e as propriedades biológicas e farmacológicas do LIM e outros terpenos, reduzindo também a dose terapêutica LIM (Araújo-Filho et al., 2017a; dos Passos Menezes et al., 2017; Lima et al., 2016). Além disso, a complexação de LIM/CD tem se mostrado um processo fácil que produz um alto rendimento de complexo de inclusão com ações bioativas mais duradouras (Araújo-Filho et al., 2017a; dos Passos Menezes et al., 2017).

Apesar de todas as vantagens apresentadas pela complexação em CDs, as formas naturais α -, β - e γ -CDs, apresentam algumas desvantagens como sua limitada solubilidade aquosa, o que aumenta sua tendência à cristalização, restringindo seu uso em soluções parenterais, sendo necessário modificar as CDs naturais para melhorar a solubilidade e reduzir a toxicidade e através da reação de β -CD com óxido de propileno em uma solução alcalina, o hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD) pode ser obtido, e apresenta cristalinidade reduzida, melhor solubilidade e menor perfil toxicológico. (Jacob and Nair, 2018; Jansook et al., 2018). Além disso, estudos recentes sobre produtos naturais mostraram que a complexação com HP β CD melhorou os efeitos biológicos das substâncias testadas (Campos et al., 2019; Lima et al., 2019; Liu et al., 2013). Assim, o presente estudo investigou os efeitos anti-hiperalgésicos do LIM e LIM complexado com hidroxipropil- β -ciclodextrina (LIM/HP β CD) em modelos de dor orofacial aguda e crônica e descreveu os prováveis mecanismos moleculares envolvidos na atividade do LIM.

REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), “a dor é uma experiência sensorial e emocional desagradável que é associada a lesões reais ou potenciais, ou descrita em termos que sugerem tal lesão” (Merskey et al., 1979). Essa capacidade de detectar estímulos nocivos tem uma função primordial de alertar o nosso organismo a danos teciduais reais ou potenciais (Ramadabran e Bansinath, 1996). Porém, quando persistente, a dor deixa de desempenhar suas funções primordiais e passa a provocar reações emocionais negativas, tornando-se debilitante e causadora de sofrimento (Griffis et al., 2006).

Em humanos a dor é constituída de componentes não somente eletrofisiológicos, como também afetivos e emocionais, que interferem de forma direta nos aspectos de intensidade de percepção da dor. Porém em estudos pré-clínicos a dor é diretamente proporcional a eletrofisiologia dos neurônios envolvidos na percepção e condução do estímulo doloroso através de fibras sensoriais nociceptivas (A δ e C). Por essa razão tem-se que nos animais a dor é definida como nocicepção, resposta de um animal a estímulos ditos nociceptivos (Loeser e Treede, 2008).

Na região da cabeça e da face essas fibras sensoriais nociceptivas aferentes são encontradas no nervo trigêmeo, nervo sensitivo motor responsável pela inervação de diversas estruturas da face, fazendo sinapse com neurônios de segunda ordem fazendo assim a condução do estímulo doloroso a regiões centrais do sistema nervoso central (Dostrovsky, 2000).

A dor orofacial é entendida como sendo uma patologia associada a tecidos moles e mineralizados da cavidade oral e da face. (Leeuw, 2010). As condições físicas relacionadas com a dor orofacial são geralmente classificadas em três áreas: músculo-esquelético, neuropática e neurovascular (Benoliel et al., 2003; Okeson et al., 2008). Woda et al. 2005, propuseram uma classificação para dor orofacial dividido em neuralgias (neuralgia trigeminal e neuralgia pós-traumática), neurovasculares e tensão (enxaqueca, cefaleia em salvas e tensão tipo dor de cabeça) e dor orofacial idiopática persistente (síndrome da boca ardente, dor atípica facial, e DTM).

O manejo da dor orofacial representa um sério problema de saúde global (Morrone et al., 2017). Afeta significativamente a qualidade de vida, devido não só à própria condição, mas também aos efeitos colaterais dos vários fármacos utilizados. O tratamento farmacológico, muitas vezes envolve o uso de medicamentos de longa duração, tais como AINEs, analgésicos opióides, antidepressivos tricíclicos e inibidores da serotonina e noradrenalina (Martin et al., 2011; Woolf;

Mannion, 1999). No entanto, devido as diversas etiologias e características das desordens, os tratamentos farmacológicos oferecem, apenas, alívio parcial da dor e pode causar efeitos secundários que são difíceis de tolerar (Romero-Reyes e Uyanik, 2014).

As plantas são importante fonte de substâncias naturais biologicamente ativas, as quais podem ser utilizadas como protótipo para a síntese de compostos ativos e/ou seletivos para o tratamento de determinada doença. A síntese é realizada por meio de estudos sobre a estrutura e a atividade biológica visando determinar quais são os fatores mais importantes relacionados à determinada atividade (Cordell, 1995).

Nos Estados Unidos 25% do total de prescrições realizadas, incluem substâncias naturais como princípio ativo obtidos de plantas de regiões temperadas e tropicais, alcançando valores estimados de US\$ 900 milhões (Braz-Filho, 2010). Nessa vertente o Brasil é mundialmente conhecido como um dos países com maior diversidade biológica, abrigando mais de 49 mil espécies de plantas em seu território, fonte de inúmeras substâncias (Peixoto; Morim, 2003).

É importante também ressaltar que a indústria farmacêutica no Brasil possui um faturamento significativo na faixa de US\$ 10 bilhões e estima-se que 5% deste faturamento seja originado de medicamentos fitoterápicos, avaliado em US\$ 500 milhões (Garcia et al., 1996; Pinto et al., 2002). Estes fatos fazem com que muitos pesquisadores investiguem as propriedades químicas e biológicas de plantas.

Dentre essas substâncias, uma classe bastante utilizada são os terpenos, que já tem uma ação biológica e farmacológica comprovada. São formados por uma unidade básica chamada isopreno, contendo hidrogênio e carbono em sua estrutura (Joca, 2012). Vários estudos demonstram as atividades farmacológicas dos terpenos, em especial atividade antifúngica, anti-inflamatória, antinociceptiva, neuroprotetora e vasorelaxante (Zore et al, 2011; Passos et al, 2007; Melo et al, 2010).

O limoneno (LIM), 4-isoprenil-1-metil-ciclo-hexeno (figura 1) é um monoterpene monocíclico presente na composição dos óleos essenciais de diversas espécies de plantas aromáticas e em óleos essenciais dos cítricos como limão laranja e tangerina (Amaral, et al, 2007). É encontrado em ambas as formas isoméricas R-(+) e S-(-), e também como misturas racêmicas. O R-(+) limoneno é o isômero mais abundante e pode ser isolado da casca da laranja, enquanto o isômero do S-(-) pode ser obtido da casca de limão (Castilho et al., 2007).

A toxicidade do LIM foi investigada pelo NTP (*National Toxicology Program*), sendo observado que após a administração diária por um período de três semanas de doses entre 413 – 6.600 mg/kg em ratos e camundongos não houve sinais de toxicidade relacionada ao composto em doses abaixo de 1.650 mg/kg (Whysner e Williams, 1996). A toxicidade do LIM também foi testada em humanos (Igimi et al., 1992; Crowell, Elson, et al., 1994), sendo evidenciado que a dose máxima tolerada por via oral de LIM foi de 15 g/dia (Vigushin et al., 1998).

Diversos estudos demonstram a ação biológica do LIM, demonstrando atividade antinociceptiva em modelos de dor não inflamatória muscular, frente a lesão do nervo ciático de roedores e na redução de hiperalgesia de origem inflamatória, atuando na diminuição da expressão de iNOS e COX-2 e inibição de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β , IL-6 através da inibição de NF- κ B e MAPK (Piccinelli et al., 2015; Araujo-Filho et al., 2017). Porém apresenta uma baixa solubilidade em água, baixa estabilidade por se tratar de um óleo. (Yoon et al., 2010; Chi et al., 2013).

As ciclodextrinas (CDs) são excipientes utilizados durante o desenvolvimento de formulações farmacêuticas para aumentar a estabilidade química e a solubilidade dos fármacos, podendo aumentar a biodisponibilidade e os efeitos farmacológicos. Além disso, é possível diminuir a dose de administração de medicamentos, reduzindo seus efeitos colaterais (Del Valle, 2004; Jansook et al., 2018; Mura, 2014).

De origem natural oriundas do amido e da celulose, as CDs são oligossacarídeos cíclicos, onde as mais conhecidas são constituídas por 6, 7 e 8 unidades de glucopirranose sendo nomeadas como α -, β - e γ -CDs respectivamente. São cristalinas, homogêneas, não higroscópicas e com estrutura tridimensional em forma de um toróide, com aberturas superior e inferior indicados pelos grupos hidroxílicos secundários e primários respectivamente. Seu exterior é hidrofílico e sua cavidade lipofílica, resultante de um ambiente rico em elétrons, vindos do oxigênio glicosídico (Atwood et al., 1996).

Levando em consideração todos os aspectos estruturais, as CDs atuam como sistemas carregadores de fármacos, pois aumentam a solubilidade em água, a estabilidade e a biodisponibilidade da molécula hóspede e diminuem a toxicidade e o seu efeito quando se trata de uma droga, (Haiyun et al., 2003). Sendo assim uma alternativa que vem sendo muito utilizada para melhoramento de substâncias farmacológicas.

No entanto, as CDs apresentam algumas desvantagens, como limitada solubilidade aquosa, que aumenta sua tendência de cristalização, restringindo seu uso em soluções parenterais. Portanto, foi necessário fazer modificações nas CDs naturais para melhorar a solubilidade e reduzir a toxicidade (Del valle, 2004; Jansook et al., 2018).

A hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD) é uma ciclodextrina modificada derivada de β -CD através de sua reação com óxido de propileno em solução alcalina, reduzindo sua cristalinidade, melhorando a solubilidade aquosa e com perfis toxicológicos mais baixos (Jansook et al., 2018). Recentes estudos demonstraram sua ação em flavonoides a exemplo da morina, onde a complexação melhorou os efeitos biológicos da substância (Lima et al., 2019). Diante disso, é de grande relevância o estudo da ação do LIM em modelos agudos e crônicos de dor orofacial.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Avaliar o efeito anti-hiperalgésico de d-limoneno puro (LIM) e d-limoneno complexado em hidroxipropil β -ciclodextrina (LIM/HP β CD) em modelos de dor orofacial em roedores.

3.2 Objetivo Específico

- Avaliar o efeito de LIM e LIM/HP β CD na nocicepção corneana induzida por solução salina hipertônica;
- Avaliar o efeito de LIM e LIM/HP β CD na nocicepção temporomandibular induzida por formalina;
- Avaliar o efeito do LIM e LIM/HP β CD no modelo de neuropatia trigeminal - Constrição do Nervo Infraorbital (IoN);
- Avaliar os níveis séricos de aspartato aminotransferase (AST) e alanina transferase (ALT);
- Verificar a relação do LIM com os receptores TRPA1 e TRPV1 através de docking molecular.
- Avaliar o envolvimento das vias TNF- α , NF κ B, p38MAPK e PKA e PKC.

DESENVOLVIMENTO

4.1 MATERIAL E MÉTODOS

4.1.1 Animais

Protocolos experimentais foram realizados em camundongos *Swiss* machos (25-35 g) e ratos *Wistar* (250-300 g) com idade de 2-3 meses, obtidos no Biotério da Universidade Federal de Sergipe (UFS). Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno, com acesso a ração (Purina, Brasil) e água, sob condições controladas de temperatura ($21 \pm 2^\circ\text{C}$), umidade e ruído. Um ciclo claro: escuro de 12 horas (luzes acesas às 6:00) foi mantido. Os protocolos experimentais respeitaram os critérios éticos para experimentação animal recomendados pela Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório (SBCAL) e pelo Conselho Internacional de Zootecnia (ICLAS) e foram aprovados pelo Comitê de Ética e Pesquisa de uso de Animais da UFS/Brasil (61/2017).

4.1.2 Preparo do complex de inclusão LIM/HP β CD

O complexo de inclusão foi preparado usando uma razão molar 1:1 of LIM e HP β CD, com base nos pesos moleculares dessas substâncias pelo método de liofilização adaptado de Lima et al., (2019). Inicialmente, HP β CD (1380 mg) foi dissolvido em 20 mL de água ultrapura e a solução foi submetida a agitação magnética em 40°C para a solubilização completa do HP β CD. O LIM (136,24 mg) foi então adicionado e a solução obtida foi submetida a agitação por um agitador magnético operando em 200 rpm à temperatura ambiente por 36 h. A solução foi congelada em -40°C por 24 h e liofilizado (Labconco®, FreeZone 4.5 model, USA). A amostra obtida (pó de complexo de inclusão) foi armazenada em recipientes de vidro âmbar herméticos e acondicionada em dry box (Arsec®, Desiccator DCV040 model, Brazil) para evitar umidade.

4.1.3 Nocicepção corneal induzida por salina hipertônica (5M)

Os camundongos foram divididos em cinco grupos ($n = 6$ animais), controle (água/tween 80%, v.o.), LIM (50 mg/kg, v.o.), LIM/HP β CD (50 mg/kg, v.o.), Sham (água/tween 80% v.o.) e Morfina (10 mg/kg, i.p.). Após uma hora, para os grupos tratados v.o. e meia hora para o grupo tratado i.p., os camundongos receberam 20 μL de NaCl 5 M (v. tópica), no olho direito para induzir a nocicepção corneal (com auxílio de uma pipeta automática foi administrado por via tópica os 20 μL de salina hipertônica). Em seguida foi contabilizado o número de limpezas na região ocular, com a pata dianteira ipsilateral, por 30 segundos. (Adaptado de FARAZIFARD et. al., 2005).

4.1.4 Nocicepção Temporomandibular Induzida por Formalina

Os ratos foram divididos em cinco grupos (n = 6 animais), controle (água/tween 80%, v.o.), LIM (50 mg/kg, v.o.), LIM/HP β CD (50 mg/kg, v.o.), Sham (água/tween 80% v.o.) e Morfina (10 mg/kg, v.o.). Uma hora após o para os grupos tratados v.o. e meia hora para o grupo tratado i.p., os animais receberam uma injeção de 50 μ L de formalina 2,5% diluída em salina isotônica, com exceção do grupo Sham que recebeu somente a introdução da agulha na região da ATM lado direito.

Após a recuperação da anestesia os animais foram colocados em caixas espelhadas e avaliados por quarenta minutos (dois blocos de 5 min e três de 10 min). O parâmetro avaliado foi o rubbing facial (ato de coçar vigorosamente a área afetada com as patas dianteiras). (Adaptado de ROVERONI et. al., 2001).

4.1.5 Docking

A estrutura dos receptores foi baixada do Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). Os receptores investigados e seus respectivos PDB de ID são: TRPA1 - 6PQO e TRPV1 - 2NYJ. O LIM foi obtido do PUBCHEM (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) ID = ED_CID_440 9117. O ligante foi submetido ao docking molecular usando o Molegro Virtual Docker v. 6.0.1 (MVD). Todos os compostos de água foram excluídos dos receptores, e o método usou as configurações de parâmetro padrão e o mesmo software com um GRID de 15 Å de raio. O algoritmo de pontuação de Moldock [GRID] foi usado como a função de pontuação e o algoritmo de pesquisa de Moldock foi usado.

4.1.6 Neuropatia do Trigêmeo – Constricção do Nervo Infraorbital (IoN)

Os ratos foram divididos em cinco grupos (n = 6 animais), controle (água/tween 80%, v.o.), LIM (50 mg/kg, v.o.), LIM/HP β CD (50 mg/kg, v.o.), Sham (água/tween 80% v.o.) e Gabapentina (100 mg/kg, v.o.).

4.1.7 Procedimento Cirúrgico

Os animais foram anestesiados com uma associação de cetamina e xilazina (80 mg/kg + 8 mg/kg). Em seguida foi feita uma incisão intraoral, permitindo que os pelos do focinho e as vibrissas permanecessem intactos, na margem gengivobucal, iniciada próximo ao primeiro molar e estendendo-se anteriormente 1 cm. O Nervo Infraorbital (IoN) foi liberado cerca de 0,5 cm do

tecido aderente, permitindo assim realizar duas ligaduras frouxas ao seu redor com fio de sutura 5.0 vicryl. A incisão foi fechada com fio de sutura 5.0 vicryl. O grupo sham passou por todo procedimento cirúrgico, porém não recebeu as ligaduras. (Adaptado de ROSSI et. al. 2012).

4.1.8 Avaliação da hiperalgesia mecânica

Os ratos foram habituados em tubos, com um acesso para que o focinho ficasse exposto, por 30 min. Em seguida foi realizado uma pré seleção dos animais a qual consistiu na aplicação crescente de 10 filamentos de Von Frey (Semmes-Weinstein monofilaments, Stoelting, USA, 0,02; 0,04; 0,07; 0,16; 0,4; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 e 10,0 g) na região inervada pelo infraorbital, em ambos os lados da face. Cada filamento foi aplicado 3 vezes consecutivas, em cada lado, com um intervalo de 30 s entre cada aplicação. Foi considerado o limiar de resposta dos animais à estimulação mecânica o filamento que provocou, por no mínimo duas vezes, comportamentos como retirada rápida da cabeça. Apenas os animais que não apresentaram, na fase de pré-seleção, estes comportamentos nociceptivos com a aplicação de todos os filamentos foram incluídos nos experimentos subsequentes, isto é, aqueles que apresentaram um limiar de resposta basal à estimulação mecânica superior a 10 g.

Cinco dias após a cirurgia CCI-IoN, os limiares de resposta ao estímulo mecânico foram novamente determinados (linha de base após a cirurgia). Após esta avaliação, os diferentes tratamentos foram iniciados, controle (água/tween 80%, v.o.), LIM (50 mg/kg, v.o.), LIM/HP β CD (50 mg/kg, v.o.), Sham (água/tween 80% v.o.) and gabapentina (100 mg/kg, v.o.), diariamente até o 28º dia, sendo os animais avaliados no 7º, 14º, 21º e 28º dias. No 10º dia (pico inflamatório), e ao final da avaliação no 28º dia, o gânglio trigeminal e o IoN foram retirados para avaliações moleculares.

4.1.9 Determinação de AST e ALT

Os níveis séricos de aspartato aminotransferase (AST) e alanina transferase (ALT) são indicadores de lesão hepática. Após 24 dias de tratamento, os animais foram anestesiados e cerca de 1,5 ml de sangue foi retirado pela veia cava posterior (Parasuraman et al., 2010). Os animais foram então eutanasiados. O sangue foi centrifugado a 1.500 rpm por 15 minutos para remover o soro e foi usado para medir AST e ALT de acordo com as instruções do kit (Labtest, Brazil).

4.1.10 Determinação dos níveis de TNF- α

Os níveis de TNF- α , no IoN, foram determinados 10 dias após a CCI-ION. As amostras foram homogeneizadas em 150 μ L de solução salina tamponada com fosfato (PBS 50 mM, pH 7.4) contendo EDTA (0.3%), nonidet P 40 (0.5%) e inibidores de proteases. As amostras foram centrifugadas a 6.000 ou 8.000 rpm por 10 min a 4°C, e o sobrenadante obtido foi utilizado para determinar os níveis de citocinas. Os níveis de TNF- α foram determinados usando ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) kits (eBioscience®) de acordo com as instruções do fabricante, e as medições colorimétricas a 450 nm foram feitas usando um leitor de microplaca (ASYS®). A concentração foi obtida por interpolação de uma curva padrão. Todos os resultados foram expressos como picogramas (pg) de citocina por miligrama (mg) de proteína total.

4.1.11 Western Blot para NF κ B, p38MAPK, PKA α e substrates de PKC fosforilados

Para o ensaio de Western blot, o gânglio trigeminal foi homogeneizado em 150 μ L de um tampão de lise RIPA consistindo em EDTA 1 mM, Tris-HCl 20 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM, EGTA 1 mM, desoxicolato de sódio 1% (p / v) , 1% (v / v) nonidet 40, contendo proteases e inibidores de fosfatases. Para a análise de eletroforese, as amostras foram dissolvidas em uma solução de 25% (v / v) contendo 0,1% (p / v) SDS, 40% de glicerol, 5% de mercaptoetanol e 50 mM de Tris-HCl com um pH de 6,8, e fervidas por 5 min. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (Emami Bistgani et al., 2017) usando BSA como padrão.

Homogenatos de tecido (50 μ g) foram separados por SDS-PAGE e transferidos para membranas de nitrocelulose (BioRad) por 1 h a 25 V em um tampão de transferência (48 Mm Tris, 39 mM de glicina, 20% de metanol). As membranas de PVDF foram lavadas por 5 min em solução salina tamponada com Tris com 0,1% Tween-20 (T-TBS; 0,5 M NaCl, 20 Mm Tris, 0,1% Tween-20, pH 7,5), seguido por 1 h de incubação em solução de bloqueio (T-TBS mais 5% de leite em pó desengordurado). Após a incubação, os blots foram incubados durante a noite a 4°C em solução de bloqueio contendo os seguintes anticorpos: anti-NF κ B [(clone D14E12), Cell Signaling Technology], anti-fosfo-NF κ B [(Ser536) (clone 93H1), Cell Signaling Technology], anti-fosfo-p38MAPK [(clone D3F9) Cell Signaling Technology], anti-p38MAPK [(clone D13E1) Cell Signaling Technology], anti PKA α (Cell Signaling Technology), Phospho- (Ser) PKC Substrate Antibody (# 2261 Cell Signaling Technology), diluído 1: 1000 e anti- β -actina [(clone 13E5) Cell Signaling Technology] diluído 1: 2000. As manchas foram então lavadas três vezes durante 10 min com T-TBS e incubadas durante 2 h em solução de bloqueio contendo IgG anti-coelho conjugada

com peroxidase diluída 1: 3000. As manchas foram lavadas três vezes novamente durante 10 min com T-TBS. Os blots foram então desenvolvidos usando um substrato de quimioluminescência. Os blots foram quantificados e os valores de densidade óptica obtidos para as proteínas estudadas. Todos os resultados foram expressos como uma razão relativa à proteína total.

4.1.12 Determinação de proteína

A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976) usando albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

4.1.13 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ S.E.M. As amostras foram avaliadas quanto à distribuição normal usando o teste de Shapiro-Wilk. As diferenças entre os grupos foram analisadas por ANOVA unilateral ou bidirecional, seguida do teste de Tukey ou teste de Bonferroni, respectivamente. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Prism Software Inc., San Diego, CA, EUA).

4.2 RESULTADOS

O efeito agudo de LIM (50 mg / kg, p.o.) e LIM/HP β CD (50 mg / kg, p.o.) foi determinado por nocicepção da córnea induzida por solução salina hipertônica e nocicepção temporomandibular induzida por formalina (Figura 1). A nocicepção corneal induzida por solução salina hipertônica produziu uma nocicepção intensa observada pelo aumento do número de limpeza do olho nos animais controle em comparação com o grupo sham ($p < 0,001$). Após o tratamento, foi possível verificar que os animais tratados com LIM e LIM/HP β CD apresentaram diminuição significativa do número de limpeza do olho ($p < 0,01$ ou $p < 0,001$) quando comparados ao grupo controle. Não houve diferença estatística entre os grupos LIM e LIM/HP β CD ($p > 0,05$). O grupo sham não mostrou aumento no número de limpeza do olho, indicando que não há nocicepção corneal (Figura 1A).

A injeção de formalina na região temporomandibular dos roedores causa comportamentos nociceptivos quantitativos e estereotipados caracterizados por rubbing (ato de coçar) da região orofacial. Esse comportamento foi fortemente exacerbado pela formalina, como foi observado no grupo controle ($p < 0,01$) (Figura 1B). Porém, o pré-tratamento com LIM ($p < 0,05$) e LIM/HP β CD ($p < 0,01$) diminuiu o tempo de rubbing facial na região temporomandibular. O efeito de LIM e LIM/HP β CD foi semelhante ao do controle positivo morfina ($p < 0,01$). Não foi observada diferença estatística entre LIM e LIM/HP β CD (Figura 1B).

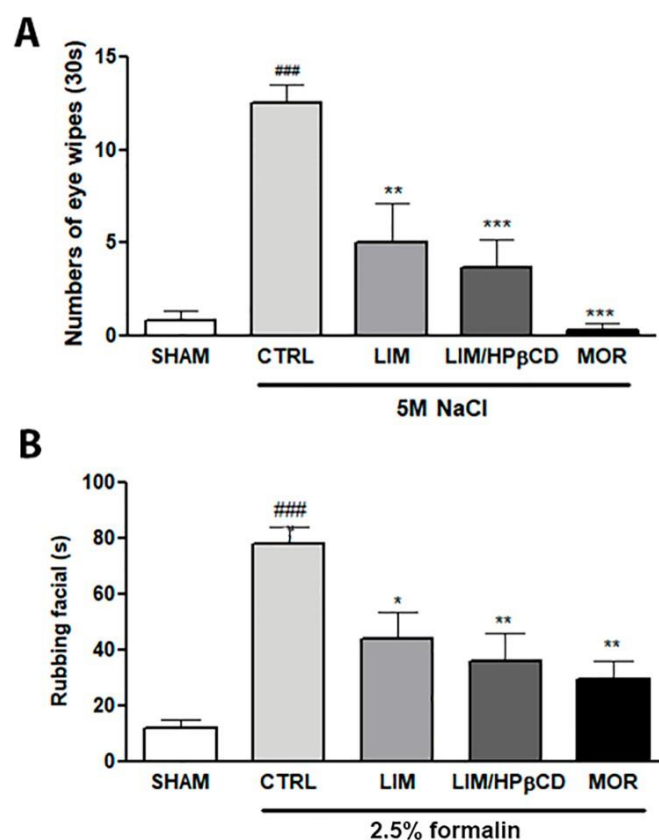


Figura 1. Avaliação do tratamento agudo com LIM ou LIM/HPβCD na nocicepção corneal induzida por solução salina hipertônica (5M) (A) e nocicepção temporomandibular induzida por formalina (B). Os animais foram tratados com LIM (50 mg/kg, v.o.), LIM/HPβCD (50 mg/kg, v.o.) ou morfina (MOR) (10 mg/kg, i.p.) e o teste foi avaliado. Os valores são expressos como média + SEM (n = 6) ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey, * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001 vs grupo de controle e ### p <0,001 vs grupo sham. CTRL = camundongos tratados com veículo.

A energia de afinidade do LIM para os receptores TRPA1 e TRPV1 foi estimada usando o software Molegro Virtual Docker v. 6.0.1 (MVD). Os compostos modelados mostraram uma ligação de energia favorável em TRPA1 (Figura 2A) com uma pontuação de docking de -9,13kcal/mol. Para TRPV1 (Figura 2B), a pontuação de docking foi de -43,11kcal/mol.

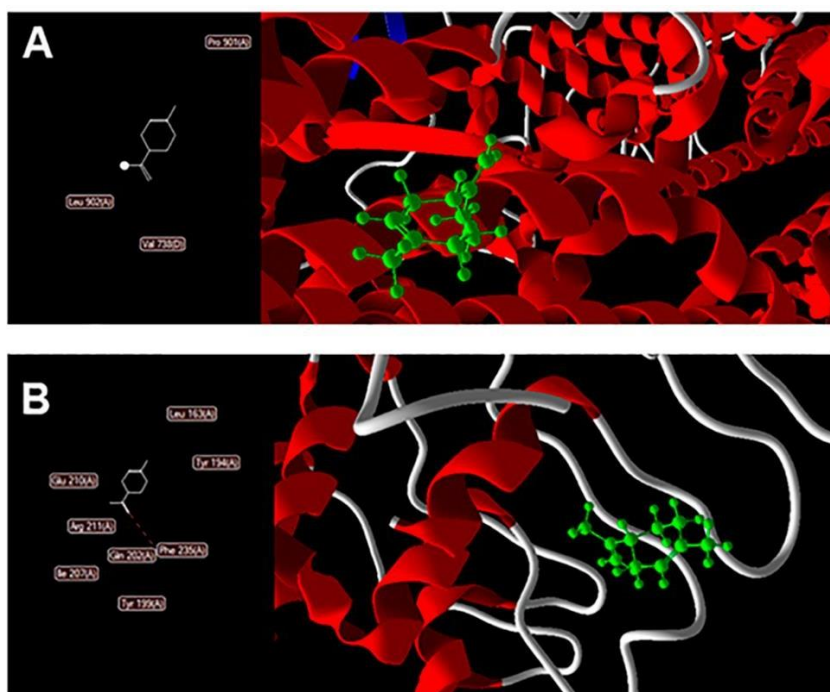


Figura 2. Vistas 2D e 3D dos resultados de docking molecular de LIM para receptores TRPA1 (A) e TRPV1 (B). Interação de LIM e receptor TRPA1 (-9,13kcal/mol) (A). Interação do LIM e do receptor TRPV1 (-43,11kcal/mol) (B). A estrutura verde representa o limoneno.

A lesão de constrição crônica do ramo infraorbital do nervo trigêmeo (CCI-IoN) produziu um comportamento nociceptivo caracterizado por uma diminuição no limiar de retirada mecânica. Este efeito persistiu durante todos os dias estudados no grupo controle (Figura 3A). Após o tratamento diário, os ratos tratados com LIM, LIM/HP β CD e GABA apresentaram aumento dos limiares de retirada da pata ($p < 0,001$) nos dias 7, 14, 21 e 28 quando comparados ao grupo controle. Além disso, os efeitos antinociceptivos de LIM e LIM/HP β CD foram semelhantes aos da gabapentina, o controle positivo. Não houve diferença estatística entre os grupos LIM e LIM/HP β CD ($p > 0,05$) em nenhum dia de avaliação (Figura 3A). A Figura 3B representa a área sob a curva de todos os tempos avaliados e mostra que LIM ($p < 0,001$) e LIM/HP β CD ($p < 0,001$) reduziram significativamente a hiperalgesia em comparação ao grupo controle. As porcentagens da intensidade do estímulo do comportamento nociceptivo calculadas com base no grupo sham foram 0,82%, 60,85%, 79,14% e 89,07% para o controle, LIM, LIM/HP β CD e gabapentina, respectivamente.

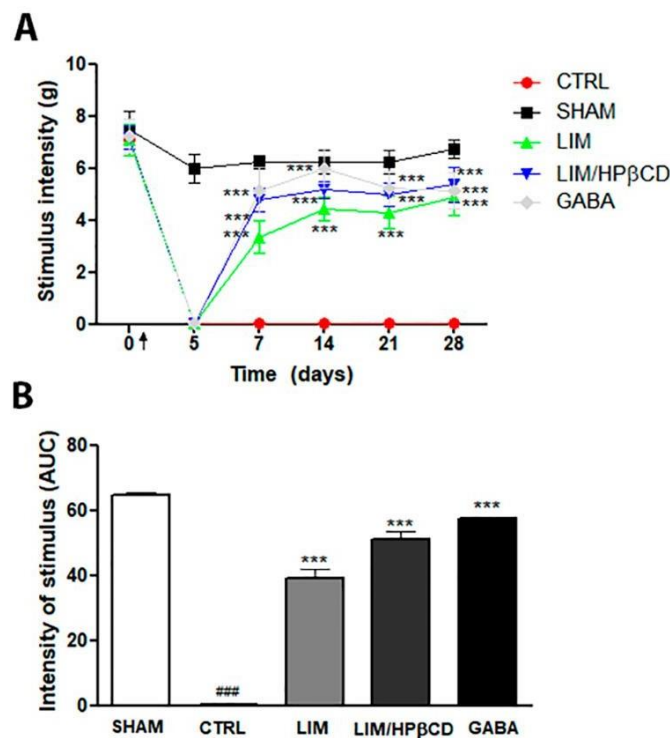


Figura 3. Avaliação da hiperalgesia mecânica induzida por lesão de CCI-IoN após tratamento diário com LIM (50 mg/kg, v.o.) ou LIM/HPβCD (50 mg/kg, v.o.) ou gabapentina (GABA) (100 mg/kg v.o.). O zero indica avaliação antes da lesão CCI-IoN e a seta indica o momento da lesão IoN (A). AUC da avaliação da hiperalgesia mecânica induzida pela lesão CCI-IoN (B). Os valores são expressos em média + SEM (n = 8). ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Bonferroni *** p < 0,001 vs grupo controle. ### p < 0,001 vs grupo Sham. CTRL = camundongos tratados com veículo.

A lesão de constrição crônica do ramo infraorbital do nervo trigêmeo causa dor inflamatória com suprarregulação de citocinas pró-inflamatórias (Michot et al., 2015). A Figura 4 representa o efeito do tratamento com LIM e LIM / HPβCD nos níveis de TNF-α no nervo trigêmeo 10 dias após o CCI-IoN. Como esperado, os resultados mostram que a lesão do nervo produz aumento na produção de TNF-α quando comparada ao grupo sham (p < 0,001). Por outro lado, o pré-tratamento com LIM (p < 0,001) e LIM/HPβCD (p < 0,01) regulou a liberação de TNF-α no nervo trigêmeo, mantendo os níveis de citocinas sham.

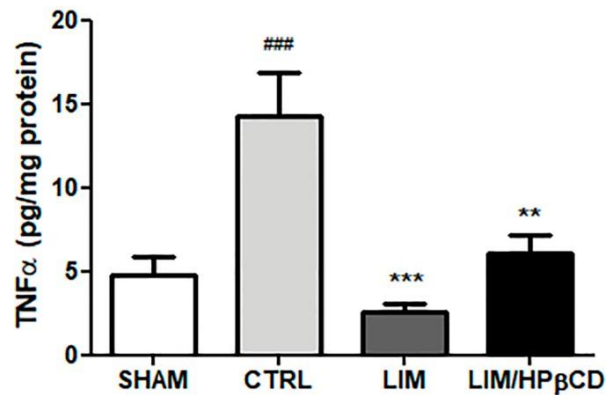


Figura 4. Efeito do tratamento crônico com LIM (50 mg/kg, v.o.) ou LIM/HPβCD (50 mg / kg, v.o.) em TNF-α no nervo trigêmeo 10 dias após lesão CCI-IoN. Os resultados são expressos como média ± SEM (n = 6). Diferenças estatisticamente relevantes foram determinadas por ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey, ** p <0,01, *** p <0,001 vs grupo controle e ### p <0,001 vs Sham. CTRL = camundongos tratados com veículo

Para avaliar os mecanismos de sinalização envolvidos no efeito antinociceptivo de LIM e LIM/HPβCD, a ativação de NFκB e p38MAPK foi avaliada no gânglio trigeminal de animais submetidos a CCI-IoN no dia 10 ou 28 após a cirurgia (Figuras 5 e 6). A análise de Western blot com anticorpos específicos contra as formas total e fosforilada/ativada de NFκB p65 encontrou um aumento nos níveis de NFκB p65 total (p <0,05) e fosforilado (p <0,05) no grupo de controle 10 dias após CCI-IoN (Figura 5A, C). O pré-tratamento com LIM e LIM/HPβCD diminuiu significativamente o imunoconteúdo-NFκB p65 total (p <0,001) e NFκB fosforilado (LIM, p <0,01, LIM/HPβCD, p <0,001) em comparação com o grupo de controle (Figuras 5A, C) no dia 10. Além disso, não houve diferença estatisticamente significativa entre LIM ou LIM/HPβCD e o grupo de controle 28 dias após CCI-IoN (p > 0,05) (Figura 5B, D).

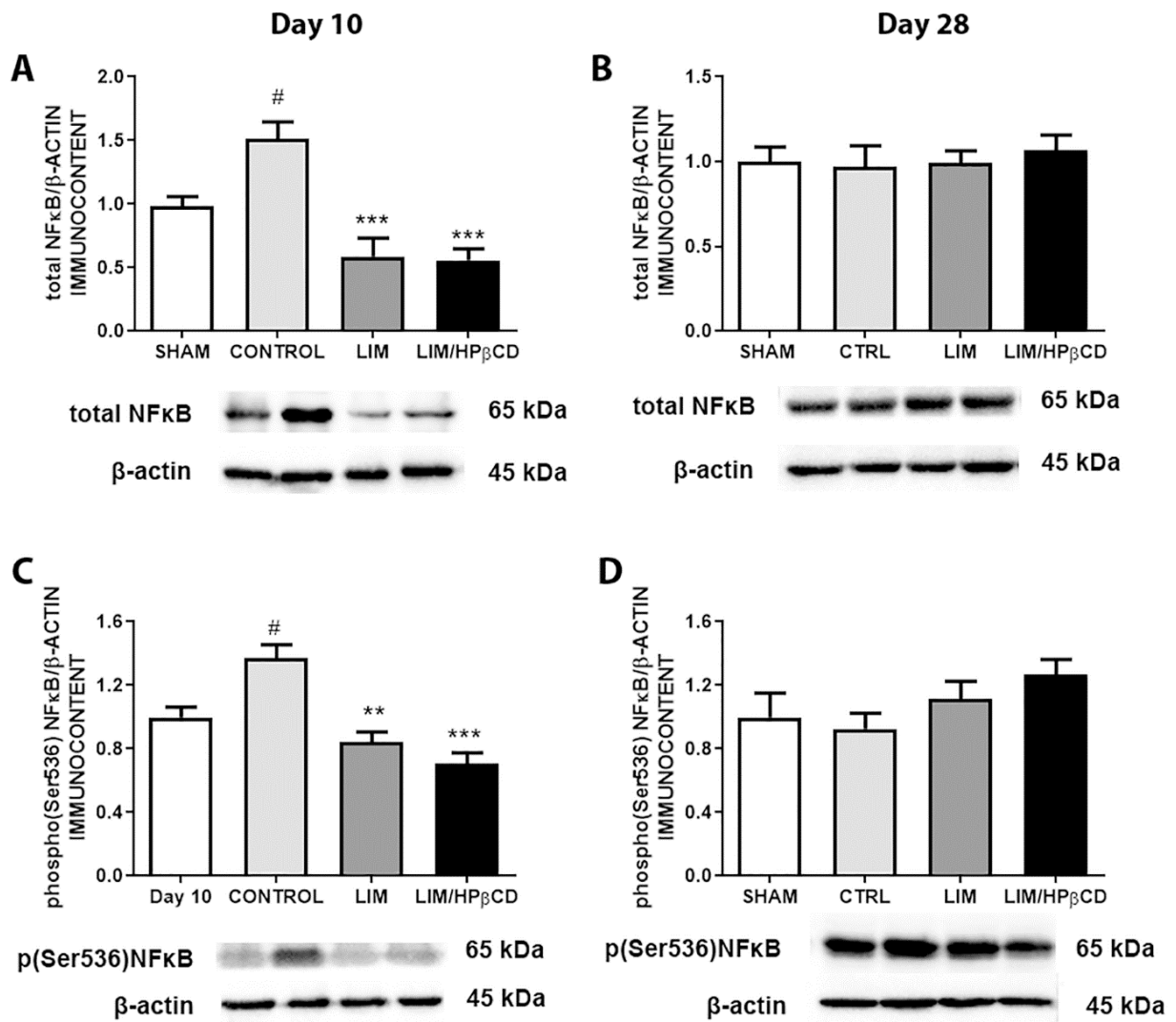


Figura 5. Efeito do tratamento crônico com LIM (50 mg/kg, v.o.) ou LIM/HPβCD (50 mg/kg, v.o.) em NFκB (A, B) e fósforo (Ser536) imunoc conteúdo NFκB (C, D) no gânglio trigêmeo 10 e 28 dias após a lesão CCI-IoN. Blots representativos são mostrados. Os resultados são expressos como média ± SEM (n = 6). Diferenças estatisticamente significativas foram determinadas por ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey, ** p <0,01, *** p <0,001 vs grupo controle e # p <0,05 vs Sham. CTRL = camundongos tratados com veículo

O efeito de LIM e LIM/HPβCD na via de sinalização p38MAPK também foi determinado no dia 10 após o CCI-IoN (Figura 6). A ativação de p38MAPK foi medida pela razão de fosfo-p38MAPK e imunoc conteúdo de p38MAPK total. Os resultados mostram que LIM (p <0,05) e LIM/HPβCD (p <0,05) diminuíram a relação fosfo-p38MAPK/totalp38MAPK quando comparados

ao grupo controle, impedindo a ativação da via MAPK no gânglio trigêmeo de ratos submetidos a CCI-IoN (Figura 6).

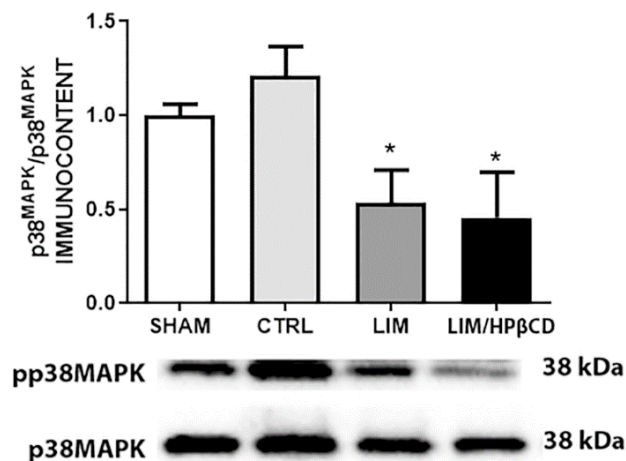


Figura 6. Efeito do tratamento crônico com LIM (50 mg/kg, v.o.) ou LIM/HPβCD (50 mg/kg, v.o.) na razão fosfo38MAPK/totalp38MAPK no gânglio trigêmeo 10 dias após lesão CCI-IoN. Blots representativos são mostrados. Os resultados são expressos como média ± SEM (n = 6). Diferenças estatisticamente significativas foram determinadas por ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey, * p < 0,05 vs grupo controle. CTRL = camundongos tratados com veículo.

Em uma tentativa de lançar luz sobre outros mecanismos de sinalização envolvidos no efeito anti-hiperalgésico de LIM e LIM/HPβCD, foi determinada a modulação de importantes quinases dependentes de segundo mensageiro associadas a comportamento doloroso, PKA e PKC. PKA e PKC são duas proteínas intimamente relacionadas ao desenvolvimento ou manutenção de dor inflamatória, neuropática e orofacial (Deng et al., 2020; Siqueira-Lima et al., 2019; Xie et al., 2015).

A Figura 7 descreve o efeito de LIM e LIM/HPβCD nos níveis de PKAα em animais CCI-IoN. Os resultados mostram uma regulação positiva do imunocontéudo de PKAα (p < 0,01) nos animais controle CCI-IoN 10 e 28 dias após a cirurgia, sugerindo ativação desta quinase. No entanto, LIM (p < 0,01) e LIM/HPβCD (p < 0,01) pré-tratamento foram capazes de diminuir significativamente o imunoconte de PKAα em ambos os períodos estudados.

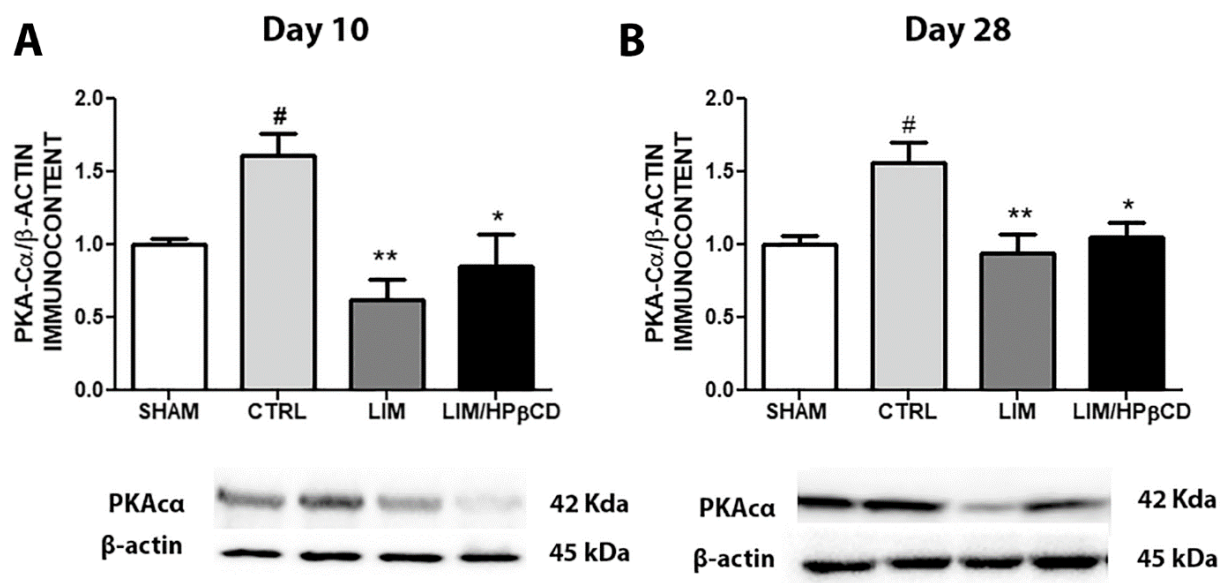


Figure 7. Efeito do tratamento crônico com LIM (50 mg/kg, v.o.) ou LIM/HP β CD (50 mg/kg, v.o.) em PKA α no gânglio trigêmeo 10 (A) e 28 (B) dias após lesão CCI-IoN. Blots representativos são mostrados. Os resultados são expressos como média $\pm$ SEM (n = 6). Diferenças estatisticamente significativas foram determinadas por ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey, * p < 0,05, ** p < 0,01 vs grupo controle e # p < 0,05 vs Sham. CTRL = camundongos tratados com veículo.

Além disso, o envolvimento de PKC no mecanismo de ação LIM e LIM/HP β CD é mostrado na Figura 8. Para determinar a atividade de PKC, a análise de western blot foi realizada usando o anticorpo substrato fosfo-(Ser) PKC. Este anticorpo reconhece níveis endógenos de várias proteínas celulares fosforiladas por PKC em resíduos de serina rodeados por arginina ou lisina. Os resultados mostraram que o CCI-IoN ativou as enzimas PKC, causando aumento da fosforilação do substrato PKC, conforme observado no grupo controle (p < 0,01). No entanto, LIM (p < 0,05) e LIM/HP β CD (p < 0,05) atenuaram a ativação de PKC e, consequentemente, reduziram os níveis de fosforilação do substrato de PKC no gânglio trigêmeo 28 dias após a cirurgia (Figura 8).

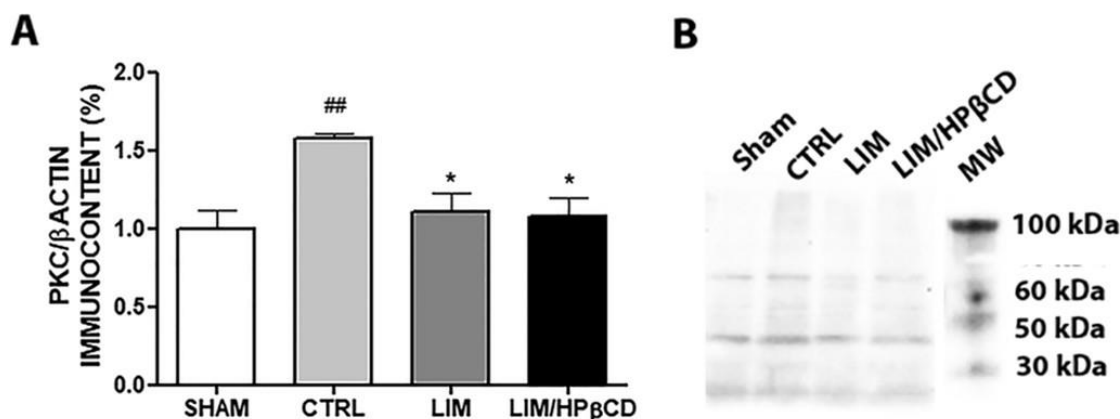


Figure 8. Efeito do tratamento crônico com LIM (50 mg/kg, v.o.) ou LIM/HPβCD (50 mg/kg, v.o.) imunoconteúdo substrato fosfo-(Ser) PKC no gânglio trigêmeo 28 dias após lesão CCI-IoN. Blots representativos são mostrados. Os resultados são expressos como média $\pm$ SEM (n = 6). Diferenças estatisticamente significativas foram determinadas por ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey, * p < 0,05 vs grupo controle e ## p < 0,05 vs Sham. CTRL = camundongos tratados com veículo.

O efeito do tratamento crônico com LIM (50 mg/kg, v.o.) ou LIM/HPβCD (50 mg/kg, v.o.) na toxicidade hepática é mostrado na Figura 9. Tratamento diário por 24 dias com LIM, puro ou complexado com HPβCD ou a gabapentina não demonstrou toxicidade hepática medida pela atividade AST e ALT no soro de ratos. Não foi observada diferença entre LIM, LIM/HPβCD e o grupo sham, bem como entre LIM, LIM/HPβCD e o grupo controle (Figura 9).

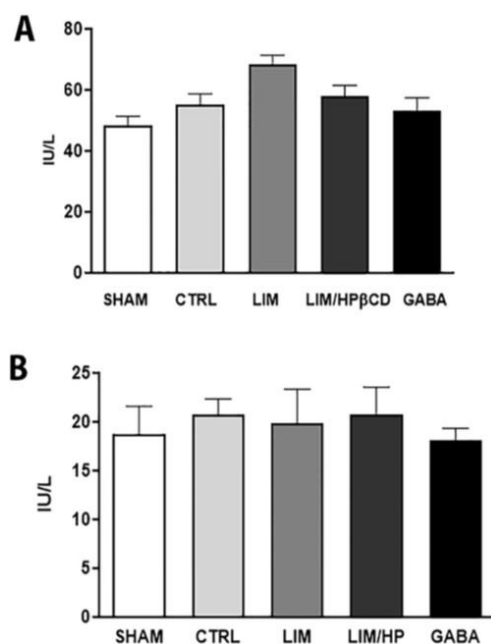


Figure 9. Efeito do tratamento crônico com LIM (50 mg/kg, v.o.), LIM/HPβCD (50 mg/kg, v.o.) ou gabapentina (GABA) (100 mg/kg v.o.) na atividade de AST (A) ou ALT (B) em soro de ratos. Os resultados são expressos como média ± SEM (n = 6). Diferenças estatisticamente significativas foram determinadas por ANOVA de uma via. CTRL = camundongos tratados com veículo.

4.3 DISCUSSÃO

Limoneno (LIM) é o principal constituinte do óleo essencial de casca de laranja e o FDA considera este monoterpeneo como GRAS (geralmente reconhecido como seguro) como um aditivo alimentar, por isso é comercializado livremente em drogarias como suplemento alimentar (Sun, 2007). Seu perfil como analgésico e antiinflamatório tem sido estudado, mas sua baixa solubilidade em água é uma limitação para uso terapêutico (Araújo-Filho et al., 2020; Dos Passos Menezes et al., 2017). Os CDs têm sido uma ferramenta farmacêutica amplamente utilizada para melhorar as características farmacológicas dos terpenos, especialmente para melhorar seus perfis analgésicos e antiinflamatórios (Lima et al., 2016; Santos et al., 2017). Assim, este estudo avaliou o potencial antinociceptivo orofacial de LIM (50 mg/kg, p.o.), não complexado e complexado com HPβCD (50 mg/kg, p.o.) em testes animais agudos e crônicos de dor orofacial. Foi demonstrado que a administração oral de LIM ou LIM/HPβCD atenuou significativamente a nocicepção da córnea e

da formalina na região trigeminal de camundongos e ratos. Além disso, LIM ou LIM/HP β CD reduziram a hiperalgesia mecânica em ratos submetidos a lesão de constrição crônica do nervo infraorbital (CCI-IoN) ao inibir a liberação de mediadores inflamatórios no gânglio trigeminal, bem como suprimir a ativação da via NF κ B por meio de p38MAPK desfosforilação/inibição. Além disso, LIM ou LIM/HP β CD bloquearam a ativação de PKA e PKC, causando inibição da abertura do canal iônico e consequentemente sensibilização periférica e central. Esses achados reforçam o perfil anti-hiperalgésico desse terpeno e mostram, pela primeira vez, seu potencial no manejo da neuropatia trigeminal. Este estudo revelou que a complexação do LIM com HP β CD reduziu a dose farmacológica efetiva deste terpeno, provavelmente por melhorar seu perfil farmacocinético.

Inicialmente, o efeito antinociceptivo do LIM e LIM/HP β CD na dor aguda do trigêmeo foi avaliado por meio do teste de nocicepção corneal. A córnea é utilizada para estudos de nocicepção no sistema trigeminal (Meng et al., 1997), uma vez que as fibras mielinizadas e amielínicas dessa região respondem a estímulos nocivos mecânicos, térmicos e químicos (Belmonte et al., 1991; Gallar et al., 1993) e os nociceptores polimodais da córnea possuem representação no gânglio trigeminal através do ramo oftálmico do nervo trigêmeo (Felipe et al., 1999). A administração de solução salina hipertônica na córnea de um roedor causa comportamento nociceptivo, e esse efeito é modulado pela ativação de alguns canais iônicos, como os receptores TRPV1 (Khalilzadeh et al., 2016; Magalhães et al., 2018). A solução salina hipertônica potencializou o comportamento nociceptivo determinado pela limpeza dos olhos e o pré-tratamento com LIM ou LIM/HP β CD atenuou a nocicepção corneal, provavelmente por atuar nos receptores TRPV1, diminuindo o influxo iônico e consequentemente afetando os mecanismos de sensibilização. Estudo anterior relatou que LIM, não complexado e complexado com β -ciclodextrina, produziu um efeito antinociceptivo na nocicepção induzida por capsaicina ao bloquear o canal TRPV1 (Araújo-Filho et al., 2017), reforçando o possível papel do LIM como um Antagonista TRPV1.

Para melhor compreender o efeito antinociceptivo do LIM e LIM/HP β CD na dor aguda do trigêmeo, realizamos o teste da formalina. O uso da formalina como estímulo pró-inflamatório e algógeno em ratos gera sinais considerados representativos da dor clinicamente observada em humanos, e a semelhança entre os dados clínicos e experimentais sugerem que o teste da formalina na articulação temporomandibular (ATM) de rato é um método eficaz modelo para avaliar os mecanismos associados às disfunções temporomandibulares (Roveroni et al., 2001; Tjølsen et al., 1992)

A injeção de formalina na região da ATM causa dor orofacial persistente (Romero-Reyes e Uyanik, 2014b) ao estimular os nociceptores aferentes, induzindo comportamentos nociceptivos (Hartwig et al., 2003; Roveroni et al., 2001). Os mecanismos de sensibilização periférica e central estão envolvidos na nocicepção induzida pela formalina, causando respostas neurogênicas e inflamatórias. O estímulo da formalina ativa o receptor do canal iônico TRPA1 e provoca a liberação de moléculas inflamatórias, como serotonina, histamina e citocinas (principalmente IL-1 β e TNF α) (Patapoutian et al., 2009; Raboisson e Dallel, 2004). Nesse contexto, a redução do comportamento nociceptivo induzido por formalina causado pelo pré-tratamento com LIM ou LIM/HP β CD pode estar relacionada a uma ação direta sobre os neurônios sensoriais aferentes primários por meio da modulação dos canais TRPA1, bem como sobre seus efeitos antiinflamatório. Dados da literatura mostram que a aplicação sistêmica do LIM produz uma ação inibitória sobre a nocicepção resultante do estresse oxidativo induzido pela ativação do TRPA1 (Kaimoto et al., 2016). Além disso, o efeito antiinflamatório desse terpeno está bem documentado na literatura científica (Kummer et al., 2013; Piccinelli et al., 2017), sugerindo que a modulação de mediadores inflamatórios poderia desempenhar um papel fundamental no perfil antinociceptivo de LIM na dor orofacial.

Assim, LIM e LIM/HP β CD têm efeito antinociceptivo agudo na dor aguda do trigêmeo. Isso pode estar relacionado à atenuação da ativação dos canais TRPV1 e TRPA1 e à modulação do processo inflamatório. Estudos têm mostrado que várias moléculas inflamatórias, como citocinas, regulam os canais TRPA1 e TRPV1 (El Karim et al., 2015, 2016; Terenzi et al., 2013), indicando uma intrincada interferência entre essas duas moléculas no desenvolvimento da dor. Também foi demonstrado que outros terpenos, como carvacrol (Alvarenga et al., 2016), α -bisabolol (Fontinele et al., 2019), carvona (Kang et al., 2015) e 1,4-cineol (Jiang et al., 2019), carvona (Kang et al., 2015) e 1,4-cineol (Jiang et al., 2015) al., 2016) apresentam efeitos semelhantes ao LIM, atuando nos canais dos TRPs ou na cascata inflamatória.

Para melhor entender a hipótese em relação à interação entre LIM e o canal TRPA1 e TRPV1, realizamos um estudo de docking que confirmou a interação intermolecular entre LIM e os canais TRPA1 e TRPV1, com valores de energia negativos de -9,13kcal / mol e - 43,11kcal / mol, respectivamente. A energia de ligação entre os alvos é favorável, pois quanto mais negativos os valores de energia, mais favorável é a interação. Os canais TRPV1 e TRPA1 estão presentes na membrana celular e têm relação direta com a despolarização celular e a transmissão de estímulos

dolorosos. Estímulos térmicos frios prejudiciais ($<17^{\circ}\text{C}$) e estímulos químicos (óleo de mostarda, mentol, formalina) podem ativar os canais TRPA1, e estímulos térmicos nocivos quentes ($> 43^{\circ}\text{C}$), estímulos químicos (capsaicina) e redução de pH podem ativar os Canais TRPV1 (Gouin et al, 2017). As substâncias que inibem esses canais têm o potencial de reduzir o estímulo doloroso, assim como as substâncias que os ativam intensificam a transmissão do estímulo doloroso (Chu et al., 2020; Ohbuchi et al., 2016; Pryde et al., 2017; Yang e Zheng, 2017). Nossos resultados comportamentais e de docking sugeriram que LIM é capaz de se ligar e modular os canais TRPA1 e TRPV1.

Como o tratamento agudo mostrou que LIM tinha um efeito antinociceptivo promissor, a próxima etapa deste estudo foi avaliar o papel desse terpeno na dor orofacial crônica, pois esta patologia é uma condição debilitante para a qual os tratamentos farmacológicos atuais muitas vezes oferecem apenas alívio parcial da dor (Araújo-Filho et al., 2018). A neuropatia trigeminal é uma síndrome de dor orofacial crônica paroxística desencadeada por vários estímulos que ocorrem em um ou mais ramos do nervo trigêmeo, como no nervo infraorbital. A CCI-IoN pode causar uma queda significativa no limiar de dor (Xia et al., 2019) e este efeito pode ser mediado pela modulação do canal TRPA1 (Demartini et al., 2018; Trevisan et al., 2016) e ativação da via inflamatória (He et al., 2020).

Estudos anteriores demonstraram que o LIM apresentou efeito antinociceptivo em diferentes modelos de dores crônicas, sem interferir na coordenação motora (Araújo-Filho et al., 2017b), e em modelos de dor neuropática (Piccinelli et al., 2017). Nesse contexto, nossos resultados mostraram que a administração oral de LIM e LIM/HP β CD reduziu a hiperalgesia causada pelo CCI-IoN, diminuindo o comportamento induzido pela dor de forma semelhante ao controle positivo gabapentina. Este efeito anti-hiperalgésico apresentado pelo LIM também foi observado em outros terpenos, como carvacrol (Silva et al., 2016), eucaliptol (Mehta et al., 2020; Melo Júnior et al., 2017) e (-) - α -bisabolol (Melo et al., 2019), bem como flavonóides (Ma et al., 2020) e extratos de sementes de uva (Cady et al., 2010). Esses achados reforçam a importância de investigar os mecanismos de ação desse terpeno na redução da dor orofacial crônica induzida por CCI-IoN e de tentar definir sua contribuição para a melhora dos sintomas da neuralgia do trigêmeo.

Os níveis de citocinas pró-inflamatórias aumentam nos nervos dentro de algumas horas após a lesão do nervo e sua produção é aumentada ainda mais quando as células inflamatórias são recrutadas para a área da lesão (Anderson e Rao, 2001; Khan et al., 2018). No presente estudo, os

níveis de TNF- α aumentaram no nervo trigêmeo 10 dias após a lesão, confirmando o processo inflamatório induzido pelo CCI-IoN. Esse achado está de acordo com estudos anteriores que descrevem uma associação entre a modulação dos níveis de citocinas pró-inflamatórias e sinais de dor orofacial (Garattini et al., 2019; Khan et al., 2018), incluindo hiperalgesia. O tratamento com LIM e LIM/HP β CD reduziu a liberação prolongada de mediadores pró-inflamatórios, conforme refletido pelos baixos níveis de TNF- α nos ratos tratados, atenuando as alterações centrais que podem resultar em dor neuropática. O perfil antiinflamatório do LIM tem sido descrito em diversos estudos, destacando o TNF- α como um dos principais alvos moleculares desse terpeno (de Souza et al., 2019; Piccinelli et al., 2017). Além disso, Piccinelli et al. (Piccinelli et al., 2017) enfatizaram que a regulação negativa da produção de citocinas desempenha um papel fundamental na ação antiinflamatória do LIM, contribuindo para seu efeito anti-hiperalgésico, corroborando nossos achados.

Os mediadores inflamatórios induzem diretamente a sensibilidade dos nervos na dor orofacial, promovendo alterações nos níveis de diversos fatores inflamatórios, como o NF κ B. Por outro lado, uma redução na estimulação da via NF κ B alivia a dor orofacial, regulando a expressão de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α (Cady et al., 2014), produzindo uma alteração na sensibilização periférica e central. É bem conhecido que a ativação do NF κ B pode contribuir para a hipersensibilidade da dor inflamatória (Lee et al., 2004; Souza et al., 2015). O pré-tratamento com LIM e LIM/HP β CD bloqueou a ativação do NF κ B no gânglio trigêmeo 10 dias após o CCI-IoN e, consequentemente, atenuou a progressão inflamatória causada pela lesão do nervo e melhorou a hiperalgesia neuropática. Dados da literatura também mostram que outros terpenos, como fitol (Carvalho et al., 2020), carvacrol (Somensi et al., 2019), L-carveol e L-carvona (Marques et al., 2019) atuam sobre o Via NF κ B, alterando a transcrição de importantes moléculas inflamatórias e oxidativas. Além disso, 28 dias após CCI-IoN, nenhuma alteração na fosforilação/ativação de NF κ B foi detectada. Este achado está de acordo com os de (Anderson e Rao, 2001), que relataram que os níveis do mediador inflamatório voltaram aos valores normais 28 dias após a lesão.

Além disso, a via do NF κ B pode ser regulada pela proteína quinase ativada por mitogênio p38 (p38MAPK), que desempenha um papel crucial no desenvolvimento da dor inflamatória orofacial (Zhu et al., 2012). A ativação de p38MAPK desempenha um papel fundamental na geração e manutenção da dor neuropática, regulando proteínas moduladoras e expressão e síntese

de receptores, além de estar envolvida na ativação de fatores de transcrição, como NF κ B (Agthong et al., 2012; Lee et al., 2010). Além disso, a inibição de TNF- α demonstrou atenuar a via de sinal p38MAPK no gânglio da raiz dorsal (Li et al., 2018). Nossos resultados mostraram que LIM e LIM/HP β CD reduziram a ativação de p38MAPK em animais submetidos a CCI-IoN, diminuindo a expressão de proteínas importantes relacionadas à hiperalgesia. A supressão da produção de TNF- α induzida pelo LIM pode estar associada ao bloqueio da via p38MAPK, contribuindo para o alívio da hiperalgesia mecânica no CCI-IoN. Estudos mostraram que LIM inibe a fosforilação/ativação de p38MAPK em vários sistemas biológicos (Bai et al., 2016; Rufino et al., 2015), corroborando nossos resultados.

PKA e PKC são duas quinases importantes que ativam as vias p38MAPK e NF κ B na dor neuropática (Deng et al., 2020; Siqueira-Lima et al., 2019). Na neuralgia do trigêmeo, a dor pode estar associada ao aumento da expressão de PKA e PKC (He et al., 2020; L. K. Koop et al., 2017). Essas vias de sinalização intracelular promovem a indução e manutenção da sensibilização central e dor persistente devido à fosforilação dos receptores de glutamato e canais iônicos, como TRPA1 e TRPV1, alterando a probabilidade de abertura do canal (Chen e Huang, 1992; W.-Q. Cui et al., 2019; Hucho e Levine, 2007; Mandadi et al., 2011) e contribuindo para o desenvolvimento da dor. Além disso, PKA e PKC aumentam a expressão de citocinas pró-inflamatórias e pró-nociceptivas (Wyatt et al., 2014). É importante mencionar que Younis (2020) relatou que LIM mitigou a lesão de infarto do miocárdio através da inibição da via MAPK/NF- κ B e um efeito anti-apoptótico.

Em nosso estudo, LIM e LIM/HP β CD inibiram a ativação de PKA e PKC no gânglio trigêmeo no modelo CCI-IoN, conseqüentemente diminuindo a fosforilação (ativação) da MAPK, a translocação do NF κ B para o núcleo (ativação) e a expressão do mediador inflamatório, contribuindo para o efeito antinociceptivo do LIM. Curiosamente, PKA permaneceu ativo até 28 dias após a lesão do nervo, enquanto LIM poderia bloquear a formação ativa de PKA em todos os dias estudados, sugerindo que esta quinase desempenha um papel importante no perfil anti-hiperalgésico deste terpeno.

Finalmente, nenhum sinal de lesão hepática foi observado nos animais tratados com LIM sozinho ou complexado com HP β CD, ou em animais tratados com gabapentina de controle positivo, indicando que essas substâncias são provavelmente seguras para tratamento crônico. Ravichandran et al. (2018) (Ravichandran et al., 2018) categorizou o R-(+)-limoneno como substância com baixa toxicidade, e o FDA o considera um GRAS. No entanto, estudos

toxicológicos adicionais são necessários para provar que a administração crônica de LIM para controlar a dor em humanos é segura.

Além disso, foi relatado que LIM possui perfil cardioprotetor (Durço et al., 2019), antitumoral (Mukhtar et al., 2018), gastroprotetor, antioxidante (de Souza et al., 2019), antinociceptivo e antiinflamatório (Piccinelli et al., 2018) e é, portanto, uma substância interessante para uso em ensaios clínicos. No entanto, as propriedades farmacocinéticas destes compostos diminuem o seu efeito terapêutico. LIM apresenta solubilidade aquosa limitada, baixa biodisponibilidade e provavelmente mostra absorção inadequada após administração oral, resultando em efeitos não duráveis (Araújo-Filho et al., 2017b; Dos Passos Menezes et al., 2017; Ravichandran et al., 2018; Zhu et al. al., 2019). A incorporação de drogas insolúveis em ciclodextrinas modifica as propriedades físico-químicas da molécula (Araújo-Filho et al., 2017c; Chi et al., 2015; Guimarães et al., 2015), melhorando a solubilidade em água, a estabilidade química e a biodisponibilidade da substância. Além disso, o uso de CDs como um sistema de drogas hospedeiro-convidado melhora as ações biológicas e reduz quaisquer possíveis efeitos colaterais dos terpenos (Araújo-Filho et al., 2017b; Brito et al., 2015; Ren et al., 2014; Thatiparti e von Recum, 2010; Yan et al., 2008) para reduzir a dose efetiva da substância.

Dessa forma, o uso de CDs melhora as propriedades físico-químicas do LIM, contribuindo para a melhor solubilidade e biodisponibilidade desse terpeno quando incorporado ao HP β CD. Uma vez que LIM e LIM/HP β CD foram usados na mesma dose nominal (50 mg/kg, p.o), a dose eficaz de LIM complexado no HP β CD é menor do que LIM sozinho, reduzindo possíveis efeitos colaterais, bem como sua toxicidade potencial. Foi demonstrado que outros terpenos, como (-) α -bisabolol (Fontinele et al., 2019), carvacrol (Silva et al., 2016) e citronelal (Santos et al., 2016), bem como limoneno complexado com β -CD (Araújo-Filho et al., 2017b), reduziram a dose antinociceptiva em relação à substância livre, como foi o caso neste estudo com LIM/HP β CD. Portanto, em nossa análise, a complexação de LIM com HP β CD foi notavelmente benéfica e mostrou que LIM/HP β CD tem um grande potencial para uso terapêutico no tratamento da dor orofacial.

CONCLUSÃO

5 CONCLUSÃO

O presente estudo sugere que LIM isolado e complexado com HP β CD produz um efeito antinociceptivo na nocicepção corneal provocada por salina hipertônica em camundongos swiss e na nocicepção temporomandibular provocada pela injeção de formalina 2,5% na ATM de ratos *wistar*, além de redução significativa na hiperalgesia mecânica na neuropatia trigeminal causada por lesão de constrição crônica do nervo infraorbital. Esses achados parecem estar relacionados ao efeito antiinflamatório do LIM, que produz redução dos níveis de citocinas pró-inflamatórias a exemplo do TNF α , e à regulação negativa da PKA e ativação da PKC no gânglio trigêmeo. Esses efeitos levam à inibição das vias p38MAPK e NF κ B, bem como ao bloqueio dos receptores TRPV1 e TRPA1, causando diminuição dos comportamentos nociceptivos nos modelos animais utilizados neste estudo (Figura 10). Nossos resultados sugerem que a complexação com HP β CD aumenta o perfil farmacológico desse terpeno, melhorando sua biodisponibilidade e solubilidade em água, melhorando assim seu efeito biológico e sem alteração nos níveis de AST e ALT dos animais em estido. No entanto, a transmissão da sensação de dor é complexa e envolve várias vias moleculares. Portanto, mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos de ação do LIM na dor orofacial.

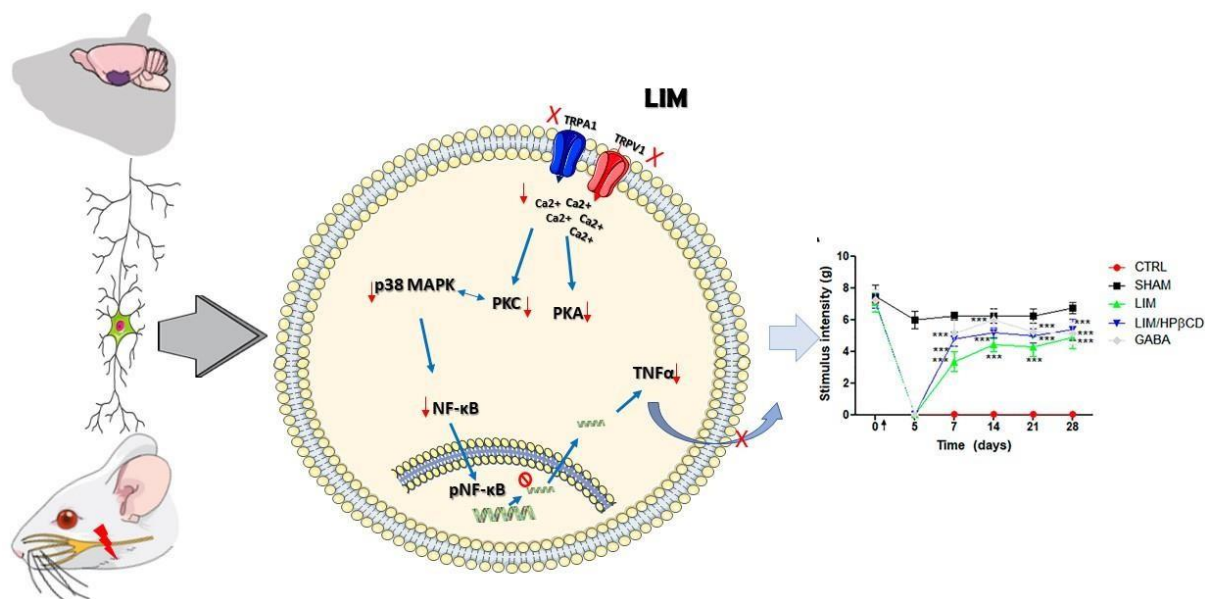


Figure 10. Proposed mechanisms of action of LIM in CCI-IoN.

REFERÊNCIAS

6. REFERÊNCIAS

- Agthong, S., Kaewsema, A., Chentanez, V., 2012. Inhibition of p38 MAPK reduces loss of primary sensory neurons after nerve transection. *Neurol. Res.* 34, 714–720.
<https://doi.org/10.1179/1743132812Y.0000000070>
- Alvarenga, E.M., Souza, L.K.M., Araújo, T.S.L., Nogueira, K.M., Sousa, F.B.M., Araújo, A.R., Martins, C.S., Pacífico, D.M., de C Brito, G.A., Souza, E.P., Sousa, D.P., Medeiros, J.V.R., 2016. Carvacrol reduces irinotecan-induced intestinal mucositis through inhibition of inflammation and oxidative damage via TRPA1 receptor activation. *Chem. Biol. Interact.* 260, 129–140.
<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.11.009>
- AMARAL, J. F. et. al. Antinociceptive Effect of the Monoterpene R-(d)-Limonene in Mice. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v. 30, n.7, p. 1217-1220, 2007.
- Anderson, L.C., Rao, R.D., 2001. Interleukin-6 and nerve growth factor levels in peripheral nerve and brainstem after trigeminal nerve injury in the rat. *Arch. Oral Biol.* 46, 633–640.
[https://doi.org/10.1016/s0003-9969\(01\)00024-3](https://doi.org/10.1016/s0003-9969(01)00024-3)
- Araújo do Nascimento, G., de Souza, D.S., Lima, B.S., de Vasconcelos, C.M.L., de Souza Araújo, A.A., Durço, A.O., Quintans-Junior, L.J., da Silva Almeida, J.R.G., Oliveira, A.P., de Santana-Filho, V.J., Barreto, A.S., dos Santos, M.R.V., 2019. Bradycardic and antiarrhythmic effects of the D-limonene in rats. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 113, 925–932. <https://doi.org/10.5935/abc.20190173>
- Araújo-Filho, H.G., Pereira, E.W.M., Campos, A.R., Quintans-Júnior, L.J., Quintans, J.S.S., 2018. Chronic orofacial pain animal models - progress and challenges. *Expert Opin Drug Discov* 13, 949–964. <https://doi.org/10.1080/17460441.2018.1524458>
- Araújo-Filho, H.G., Pereira, E.W.M., Heimfarth, L., Souza Monteiro, B., Santos Passos, F.R., Siqueira-Lima, P., Gandhi, S.R., Viana Dos Santos, M.R., Guedes da Silva Almeida, J.R., Picot, L., Grougnet, R., Almeida, R.S., Douglas Melo Coutinho, H., Quintans-Júnior, L.J., Martins, N., Quintans, J.S.S., 2020. Limonene, a food additive, and its active metabolite perillyl alcohol improve regeneration and attenuate neuropathic pain after peripheral nerve injury: Evidence for IL-1 β , TNF- α , GAP, NGF and ERK involvement. *Int Immunopharmacol* 86, 106766.
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106766>
- Araújo-Filho, H.G., Pereira, E.W.M., Rezende, M.M., Menezes, P.P., Araújo, A.A.S., Barreto, R.S.S., Martins, A.O.B.P.B., Albuquerque, T.R., Silva, B.A.F., Alcantara, I.S., Coutinho, H.D.M., Menezes, I.R.A., Quintans-Júnior, L.J., Quintans, J.S.S., 2017. D-limonene exhibits superior antihyperalgesic effects in a β -cyclodextrin-complexed form in chronic musculoskeletal pain

- reducing Fos protein expression on spinal cord in mice. *Neuroscience* 358, 158–169.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.06.037>
- ATWOOD D.K. et. al. An assessment of global warming stress on Caribbean coral reef ecosystems. *Bull. Mar. Sci.* n. 51 p. 118-130, 1992.
- Badel, T., Zadavec, D., Kes, V.B., Smoljan, M., Lovko, S.K., Zavoreo, I., Krapac, L., Milošević, S.A., 2019. Orofacial pain – diagnostic and therapeutic challenges. *Acta Clinica Croatica* 58, 82–89.
<https://doi.org/10.20471/acc.2019.58.s1.12>
- Bai, J., Zheng, Y., Wang, G., Liu, P., 2016. Protective Effect of D-Limonene against Oxidative Stress-Induced Cell Damage in Human Lens Epithelial Cells via the p38 Pathway. *Oxid Med Cell Longev* 2016, 5962832. <https://doi.org/10.1155/2016/5962832>
- Belmonte, C., Gallar, J., Pozo, M.A., Rebollo, I., 1991. Excitation by irritant chemical substances of sensory afferent units in the cat's cornea. *J. Physiol. (Lond.)* 437, 709–725.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1991.sp018621>
- BENOLIEL R, et al. Management of chronic orofacial pain: today and tomorrow. *Compend Contin Educ Dent.* 2003;24:909-20, 922-4, 926-8 passim; quiz 932.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248–254.
- Braz Filho, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. *Química Nova*, v. 33, n.1, p. 229-239, 2010
- Brito, R.G., Araújo, A.A.S., Quintans, J.S.S., Sluka, K.A., Quintans-Júnior, L.J., 2015. Enhanced analgesic activity by cyclodextrins - a systematic review and meta-analysis. *Expert Opin Drug Deliv* 12, 1677–1688. <https://doi.org/10.1517/17425247.2015.1046835>
- Cady, R.J., Denson, J.E., Sullivan, L.Q., Durham, P.L., 2014. Dual orexin receptor antagonist 12 inhibits expression of proteins in neurons and glia implicated in peripheral and central sensitization. *Neuroscience* 269, 79–92. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.03.043>
- Cady, R.J., Hirst, J.J., Durham, P.L., 2010. Dietary grape seed polyphenols repress neuron and glia activation in trigeminal ganglion and trigeminal nucleus caudalis. *Mol Pain* 6, 91.
<https://doi.org/10.1186/1744-8069-6-91>
- Campos, C.A., Lima, B.S., Trindade, G.G.G., Souza, E.P.B.S.S., Mota, D.S.A., Heimfarth, L., Quintans, J.S.S., Quintans-Júnior, L.J., Sussuchi, E.M., Sarmiento, V.H.V., Carvalho, F.M.S., Marreto, R.N., Costa, R.M.R., Nunes, R.S., Araújo, A.A.S., Shanmugam, S., Thangaraj, P., 2019. Anti-hyperalgesic and anti-inflammatory effects of citral with β -cyclodextrin and hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complexes in animal models. *Life Sciences* 229, 139–148.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.05.026>

- Cao, Y., Li, K., Fu, K.Y., Xie, Q.F., Chiang, C.Y., Sessle, B.J., 2013. Central sensitization and MAPKs are involved in occlusal interference-induced facial pain in rats. *Journal of Pain* 14, 793–807. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2013.02.005>
- Carvalho, A.M.S., Heimfarth, L., Pereira, E.W.M., Oliveira, F.S., Menezes, I.R.A., Coutinho, H.D.M., Picot, L., Antoniolli, A.R., Quintans, J.S.S., Quintans-Júnior, L.J., 2020. Phytol, a Chlorophyll Component, Produces Antihyperalgesic, Anti-inflammatory, and Antiarthritic Effects: Possible NFκB Pathway Involvement and Reduced Levels of the Proinflammatory Cytokines TNF-α and IL-6. *J. Nat. Prod.* <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01116>
- CARLSSON, G. E.; DEBOEVER, J. A. *Epidemiologia. Disfunção da Articulação Temporomandibular e dos Músculos da Mastigação*. São Paulo, Livraria Santos; p. 159-170, 2000.
- Chen, L., Huang, L.Y., 1992. Protein kinase C reduces Mg²⁺ block of NMDA-receptor channels as a mechanism of modulation. *Nature* 356, 521–523. <https://doi.org/10.1038/356521a0>
- CHI, G. et al. Suppression of MAPK and NF-kappaB pathways by limonene contributes to attenuation of lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in acute lung injury. *Inflammation*, v. 36, n. 2, p. 501-11, Apr 2013.
- Chi, L., Liu, R., Guo, T., Wang, M., Liao, Z., Wu, L., Li, H., Wu, D., Zhang, J., 2015. Dramatic improvement of the solubility of pseudolaric acid B by cyclodextrin complexation: preparation, characterization and validation. *Int J Pharm* 479, 349–356. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.01.005>
- Cho, A., Terse, A., Pertusa, M., Madrid, R., 2016. Targeted overexpression of tumor necrosis factor-α increases cyclin-dependent kinase 5 activity and 157, 1346–1362.
- Chu, Y., Cohen, B.E., Chuang, H.-H., 2020. A single TRPV1 amino acid controls species sensitivity to capsaicin. *Sci Rep* 10, 8038. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64584-2>
- Clark, G.T., Padilla, M., Dionne, R., 2016. Medication Treatment Efficacy and Chronic Orofacial Pain. *Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America* 28, 409–421. <https://doi.org/10.1016/j.coms.2016.03.011>
- Conti, P.C.R., Pinto-Fiamengui, L.M.S., Cunha, C.O., Conti, A.C. de C.F., 2012. Orofacial pain and temporomandibular disorders - the impact on oral health and quality of life. *Brazilian Oral Research* 26, 120–123. <https://doi.org/10.1590/S1806-83242012000700018>
- Cordell, G.A. Changing strategies in natural products chemistry. *Phytochemistry*. v. 40, n. 6, p. 1585-1612, 1995.
- Crowell, P. L. et al. Human metabolism of the experimental cancer therapeutic agent d-limonene. *Cancer Chemother Pharmacol*, v. 35, n. 1, p. 31-7, 1994.

- Cui, W.Q., Chu, Y.X., Xu, F., Chen, T., Gao, L., Feng, Y., Hu, X.M., Yang, W., Du, L.X., Zhang, W.W., Mao-Ying, Q.L., Mi, W.L., Wang, Y.Q., 2019. Calcium Channel $\alpha 2\delta 1$ Subunit Mediates Secondary Orofacial Hyperalgesia Through PKC-TRPA1/Gap Junction Signaling. *Journal of Pain*. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2019.08.012>
- Damasceno, M.B. et al. Frutalin reduces acute and neuropathic nociceptive behaviours in rodent models of orofacial pain. *Chemico-biological Interactions*, v. 256, p.9-15, 2016.
- de Oliveira, B.A., Alves Rodrigues Santos, S.A., Menezes Pereira, E.W., Nogueira, A.B., Vieira Neto, A.E., de Melo Júnior, J. de M. de A., Damasceno, M. de B.M.V., Quintans-Júnior, L.J., Sessle, B.J., Magalhães, F.E.A., Campos, A.R., 2020. Orofacial Antinociceptive Effect of Nifedipine in Rodents Is Mediated by TRPM3, TRPA1, and NMDA Processes. *J Oral Facial Pain Headache* 34, 174–186. <https://doi.org/10.11607/ofph.2491>
- de Souza, M.C., Vieira, A.J., Beserra, F.P., Pellizzon, C.H., Nóbrega, R.H., Rozza, A.L., 2019. Gastroprotective effect of limonene in rats: Influence on oxidative stress, inflammation and gene expression. *Phytomedicine* 53, 37–42. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.09.027>
- Del Valle, E.M.M. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochemistry*, v. 39, n. 9, p.1033-1046, maio 2004.
- Demartini, C., Greco, R., Zanaboni, A.M., Francesconi, O., Nativi, C., Tassorelli, C., Deseure, K., 2018. Antagonism of Transient Receptor Potential Ankyrin Type-1 Channels as a Potential Target for the Treatment of Trigeminal Neuropathic Pain: Study in an Animal Model. *Int J Mol Sci* 19. <https://doi.org/10.3390/ijms19113320>
- Deng, Y., Yang, L., Xie, Q., Yang, F., Li, G., Zhang, G., Li, S., Wu, Z., Wang, J., Kang, X., 2020. Protein Kinase A Is Involved in Neuropathic Pain by Activating the p38MAPK Pathway to Mediate Spinal Cord Cell Apoptosis. *Mediators Inflamm* 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/6420425>
- dos Passos Menezes, P., dos Santos, P.B.P., Dória, G.A.A., de Sousa, B.M.H., Serafini, M.R., Nunes, P.S., Quintans-Júnior, L.J., de Matos, I.L., Alves, P.B., Bezerra, D.P., Mendonça Júnior, F.J.B., da Silva, G.F., de Aquino, T.M., de Souza Bento, E., Scotti, M.T., Scotti, L., de Souza Araujo, A.A., 2017. Molecular Modeling and Physicochemical Properties of Supramolecular Complexes of Limonene with α - and β -Cyclodextrins. *AAPS PharmSciTech* 18, 49–57. <https://doi.org/10.1208/s12249-016-0516-0>
- Dostrovsky, J.O. Role of thalamus in pain. *Prog. Brain Res.* v. 129, p. 245-245, 2000.
- Durço, A.O., de Souza, D.S., Heimfarth, L., Miguel-Dos-Santos, R., Rabelo, T.K., Oliveira Barreto, T. de, Rhana, P., Santos Santana, M.N., Braga, W.F., Santos Cruz, J.D., Lauton-Santos, S., Santana-Filho, V.J. de, Barreto, R. de S.S., Guimarães, A.G., Alvarez-Leite, J.I., Quintans Júnior, L.J., Vasconcelos, C.M.L. de, Santos, M.R.V.D., Barreto, A.S., 2019. d-Limonene Ameliorates

- Myocardial Infarction Injury by Reducing Reactive Oxygen Species and Cell Apoptosis in a Murine Model. *J. Nat. Prod.* 82, 3010–3019. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b00523>
- El Karim, I., McCrudden, M.T.C., Linden, G.J., Abdullah, H., Curtis, T.M., McGahon, M., About, I., Irwin, C., Lundy, F.T., 2015. TNF- α -induced p38MAPK activation regulates TRPA1 and TRPV4 activity in odontoblast-like cells. *Am. J. Pathol.* 185, 2994–3002. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.07.020>
- El Karim, I.A., McCrudden, M.T.C., McGahon, M.K., Curtis, T.M., Jeanneau, C., Giraud, T., Irwin, C.R., Linden, G.J., Lundy, F.T., About, I., 2016. Biodentine Reduces Tumor Necrosis Factor Alpha-induced TRPA1 Expression in Odontoblastlike Cells. *J Endod* 42, 589–595. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2015.12.017>
- Emami Bistgani, Z., Siadat, S.A., Bakhshandeh, A., Ghasemi Pirbalouti, A., Hashemi, M., 2017. Interactive effects of drought stress and chitosan application on physiological characteristics and essential oil yield of *Thymus daenensis* Celak. *Crop Journal* 5, 407–415. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2017.04.003>
- Farazifard, R., Safarpour, F., Sheibani, V., Javan, M., 2005. Eye-wiping test: A sensitive animal model for acute trigeminal pain studies. *Brain Research Protocols* 16, 44–49. <https://doi.org/10.1016/j.brainresprot.2005.10.003>
- Felipe, null, Gonzalez, null, Gallar, null, Belmonte, null, 1999. Quantification and immunocytochemical characteristics of trigeminal ganglion neurons projecting to the cornea: effect of corneal wounding. *Eur J Pain* 3, 31–39. <https://doi.org/10.1053/eujp.1998.0100>
- Fiorentino, P.M.; Cairns, B.E.; Hu, J.W. Development of inflammation after application of mustard oil or glutamate to the rat temporomandibular joint. *Archives Of Oral Biology*. v. 44, n. 1, p. 27-32, 1999.
- Fontinele, L.L., Heimfarth, L., Pereira, E.W.M., Rezende, M.M., Lima, N.T., Barbosa Gomes de Carvalho, Y.M., Afonso de Moura Pires, E., Guimarães, A.G., Bezerra Carvalho, M.T., de Souza Siqueira Barreto, R., Campos, A.R., Antonioli, A.R., Antunes de Souza Araújo, A., Quintans-Júnior, L.J., de Souza Siqueira Quintans, J., 2019. Anti-hyperalgesic effect of (-)- α -bisabolol and (-)- α -bisabolol/ β -Cyclodextrin complex in a chronic inflammatory pain model is associated with reduced reactive gliosis and cytokine modulation. *Neurochem. Int.* 131, 104530. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2019.104530>
- Gallar, J., Pozo, M.A., Tuckett, R.P., Belmonte, C., 1993. Response of sensory units with unmyelinated fibres to mechanical, thermal and chemical stimulation of the cat's cornea. *J Physiol* 468, 609–622.
- García, D. et al. Estudio farmacognóstico de caléndula (*Calendula officinalis* L.). *Rev. Cubana Plant Med.* v. 1, n. 3, p. 21-25, 1996.

- Garattini, E.G., Santos, B.M., Ferrari, D.P., Capel, C.P., Francescato, H.D.C., Coimbra, T.M., Leite-Panissi, C.R.A., Branco, L.G.S., Nascimento, G.C., 2019. Propargylglycine decreases neuro-immune interaction inducing pain response in temporomandibular joint inflammation model. *Nitric Oxide* 93, 90–101. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2019.10.001>
- Gonçalves, D.A.G., Speciali, J.G., Jales, L.C.F., Camparis, C.M., Bigal, M.E., 2009. Temporomandibular symptoms, migraine, and chronic daily headaches in the population. *Neurology* 73, 645–646. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181b389c2>
- Guimarães, A.G., Oliveira, M.A., Alves, R.D.S., Menezes, P.D.P., Serafini, M.R., De Souza Araújo, A.A., Bezerra, D.P., Quintans, L.J., 2015. Encapsulation of carvacrol, a monoterpene present in the essential oil of oregano, with β -cyclodextrin, improves the pharmacological response on cancer pain experimental protocols. *Chemico-Biological Interactions* 227, 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.12.020>
- Guimarães, A.G., Quintans, J.S.S., Quintans-Júnior, L.J., 2013. Monoterpenes with analgesic activity - A systematic review. *Phytotherapy Research* 27, 1–15. <https://doi.org/10.1002/ptr.4686>
- Griffis, C.A., Compton, P., Doering, L. The effect of pain on leucocyte cellular adhesion molecules. *Biol Res Nurs*. v. 7, p. 297-312, 2006.
- Häggman-Henrikson, B., Alstergren, P., Davidson, T., Högestätt, E.D., Östlund, P., Tranæus, S., Vitols, S., List, T., 2017. Pharmacological treatment of oro-facial pain – health technology assessment including a systematic review with network meta-analysis. *Journal of Oral Rehabilitation* 44, 800–826. <https://doi.org/10.1111/joor.12539>
- Hargreaves, K.M., 2011. Orofacial pain. *Pain* 152, S25–S32. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2010.12.024>
- Hartwig, A.C., Mathias, S.I., Law, A.S., Gebhart, G.F., 2003. Characterization and opioid modulation of inflammatory temporomandibular joint pain in the rat. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 61, 1302–1309. [https://doi.org/10.1016/s0278-2391\(03\)00732-8](https://doi.org/10.1016/s0278-2391(03)00732-8)
- Haiyun D. Et. Al. Preparation and spectral investigation on inclusion complex of β -cyclodextrin with rutin. *Spectrochimica Acta Part A*. v. 59 p. 3421–3429, 2003.
- Hargreaves Km. Orofacial pain. *Pain*. v. 152 n. 3, p. 25-32, 2011.
- He, L., Liu, L., Guan, S., Zheng, X., Ge, H., Yin, C., Shen, Y., Tan, M., Wang, C., Gao, Y., Xiong, W., 2020. Palmatine alleviates hyperalgesia by inhibiting the expression of calcitonin gene-related peptide in the trigeminal ganglion of rats with chronic constriction injury of the infraorbital nerve. *Br J Oral Maxillofac Surg*. <https://doi.org/10.1016/j.bjoms.2020.01.031>
- Hersh, E. V., Balasubramaniam, R., Pinto, A., 2008. Pharmacologic Management of Temporomandibular Disorders. *Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America* 20, 197–210. <https://doi.org/10.1016/j.coms.2007.12.005>

- Hirota, R. et. al. Anti-inflammatory Effects of Limonene from Yuzu (*Citrus junos* Tanaka) Essential Oil on Eosinophils. *Journal of Food Science*, v. 75, n. 3, p. 87-92, 2010.
- Hucho, T., Levine, J.D., 2007. Signaling pathways in sensitization: toward a nociceptor cell biology. *Neuron* 55, 365–376. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.07.008>
- Jacob, S., Nair, A.B., 2018. Cyclodextrin complexes: Perspective from drug delivery and formulation. *Drug Development Research* 79, 201–217. <https://doi.org/10.1002/ddr.21452>
- Jansook, P., Ogawa, N., Loftsson, T., 2018. Cyclodextrins: structure, physicochemical properties and pharmaceutical applications. *International Journal of Pharmaceutics* 535, 272–284. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.11.018>
- Jiang, C.-Y., Wang, C., Xu, N.-X., Fujita, T., Murata, Y., Kumamoto, E., 2016. 1,8- and 1,4-cineole enhance spontaneous excitatory transmission by activating different types of transient receptor potential channels in the rat spinal substantia gelatinosa. *J. Neurochem.* 136, 764–777. <https://doi.org/10.1111/jnc.13433>
- Joca, H. C. et. al. Carvacrol decreases neuronal excitability by inhibition of voltage-gated sodium channels. *Journal of Natural Products*. v. 75, n. 9, p. 1511-1517, 2012.
- Kaimoto, T., Hatakeyama, Y., Takahashi, K., Imagawa, T., Tominaga, M., Ohta, T., 2016. Involvement of transient receptor potential A1 channel in algescic and analgesic actions of the organic compound limonene. *Eur J Pain* 20, 1155–1165. <https://doi.org/10.1002/ejp.840>
- Kang, Q., Jiang, C.-Y., Fujita, T., Kumamoto, E., 2015. Spontaneous L-glutamate release enhancement in rat substantia gelatinosa neurons by (-)-carvone and (+)-carvone which activate different types of TRP channel. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 459, 498–503. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.02.135>
- Khalilzadeh, E., Hazrati, R., Saiah, G.V., 2016. Effects of topical and systemic administration of *Eugenia caryophyllata* buds essential oil on corneal anesthesia and analgesia. *Res Pharm Sci* 11, 293–302. <https://doi.org/10.4103/1735-5362.189297>
- Khan, J., Noboru, N., Imamura, Y., Eliav, E., 2018. Effect of Pregabalin and Diclofenac on tactile allodynia, mechanical hyperalgesia and pro inflammatory cytokine levels (IL-6, IL-1 β) induced by chronic constriction injury of the infraorbital nerve in rats. *Cytokine* 104, 124–129. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2017.10.003>
- Koop, L., Hawkins, J., Cornelison, L., Durham, P., 2017. Central Role of Protein Kinase A in Promoting Trigeminal Nociception in an In Vivo Model of Temporomandibular Disorders. *Journal of Oral & Facial Pain and Headache* 31, 264–274. <https://doi.org/10.11607/ofph.1803>
- Kulich, R.J., Backstrom, J., Brownstein, J., Finkelman, M., Dhadwal, S., DiBenedetto, D., 2016. A Model for Opioid Risk Stratification: Assessing the Psychosocial Components of Orofacial Pain.

- Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America 28, 261–273.
<https://doi.org/10.1016/j.coms.2016.03.006>
- Kummer, R., Fachini-Queiroz, F.C., Estevão-Silva, C.F., Grespan, R., Silva, E.L., Bersani-Amado, C.A., Cuman, R.K.N., 2013. Evaluation of Anti-Inflammatory Activity of Citrus latifolia Tanaka Essential Oil and Limonene in Experimental Mouse Models. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013, 859083. <https://doi.org/10.1155/2013/859083>
- Lee, K.-M., Jeon, S.-M., Cho, H.-J., 2010. Interleukin-6 induces microglial CX3CR1 expression in the spinal cord after peripheral nerve injury through the activation of p38 MAPK. *Eur J Pain* 14, 682.e1–12. <https://doi.org/10.1016/j.ejpain.2009.10.017>
- Lee, K.-M., Kang, B.-S., Lee, H.-L., Son, S.-J., Hwang, S.-H., Kim, D.-S., Park, J.-S., Cho, H.-J., 2004. Spinal NF- κ B activation induces COX-2 upregulation and contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *Eur. J. Neurosci.* 19, 3375–3381. <https://doi.org/10.1111/j.0953-816X.2004.03441.x>
- Li, C., Deng, T., Shang, Z., Wang, D., Xiao, Y., 2018. Blocking TRPA1 and TNF- α Signal Improves Bortezomib-Induced Neuropathic Pain. *Cell. Physiol. Biochem.* 51, 2098–2110.
<https://doi.org/10.1159/000495828>
- Li, P.H., Chiang, B.H., 2012. Process optimization and stability of d-limonene-in-water nanoemulsions prepared by ultrasonic emulsification using response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry* 19, 192–197. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2011.05.017>
- Lima, B. dos S., Campos, C. de A., da Silva Santos, A.C.R., Santos, V.C.N., Trindade, G. das G.G., Shanmugam, S., Pereira, E.W.M., Marreto, R.N., Duarte, M.C., Almeida, J.R.G. da S., Quintans, J. de S.S., Quintans, L.J., Araújo, A.A. de S., 2019. Development of morin/hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex: Enhancement of bioavailability, antihyperalgesic and anti-inflammatory effects. *Food and Chemical Toxicology* 126, 15–24.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.01.038>
- Lima, P.S.S., Lucchese, A.M., Araújo-Filho, H.G., Menezes, P.P., Araújo, A.A.S., Quintans-Júnior, L.J., Quintans, J.S.S., 2016. Inclusion of terpenes in cyclodextrins: Preparation, characterization and pharmacological approaches. *Carbohydr Polym* 151, 965–987.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.06.040>
- Lipton, J.A., Ship, J.A., Larach-Robinson, D., 1993. Estimated prevalence and distribution of reported orofacial pain in the United States. *Journal of the American Dental Association* (1939) 124, 115–121. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.1993.0200>

- Liu, B., Zhu, X., Zeng, J., Zhao, J., 2013. Preparation and physicochemical characterization of the supramolecular inclusion complex of naringin dihydrochalcone and hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Food Research International* 54, 691–696. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.08.007>
- Liu, F., Zhang, Y.Y., Song, N., Lin, J., Liu, M. ke, Huang, C.L., Zhou, C., Wang, H., Wang, M., Shen, J.F., 2019. GABAB receptor activation attenuates inflammatory orofacial pain by modulating interleukin-1 β in satellite glial cells: Role of NF- κ B and MAPK signaling pathways. *Brain Research Bulletin* 149, 240–250. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2019.04.018>
- Loeser, J.D. E Treede, R-D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. *Pain*. v. 137, p. 473–477, 2008.
- Ma, Y., Liu, S., Shu, H., Crawford, J., Xing, Y., Tao, F., 2020. Resveratrol alleviates temporomandibular joint inflammatory pain by recovering disturbed gut microbiota. *Brain Behav. Immun.* <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.01.016>
- Macfarlane, T. V., Blinkhorn, A.S., Davies, R.M., Ryan, P., Worthington, H. V., Macfarlane, G.J., 2002. Orofacial pain: Just another chronic pain? Results from a population-based survey. *Pain* 99, 453–458. [https://doi.org/10.1016/S0304-3959\(02\)00181-1](https://doi.org/10.1016/S0304-3959(02)00181-1)
- Magalhães, F.E.A., Batista, Francisco Lucas Alves, Lima, L.M.G., Abrante, Izamar de Araújo, Batista, Francisca Leidivânia Alves, Abrante, Izabel de Araújo, de Araújo, J.I.F., Santos, S.A.A.R., de Oliveira, B.A., Raposo, R. da S., Campos, A.R., 2018. Adult Zebrafish (*Danio rerio*) As a Model for the Study of Corneal Antinociceptive Compounds. *Zebrafish* 15, 566–574. <https://doi.org/10.1089/zeb.2018.1633>
- Mandadi, S., Armati, P.J., Roufogalis, B.D., 2011. Protein kinase C modulation of thermo-sensitive transient receptor potential channels: Implications for pain signaling. *J Nat Sci Biol Med* 2, 13–25. <https://doi.org/10.4103/0976-9668.82311>
- Marques, F.M., Figueira, M.M., Schmitt, E.F.P., Kondratyuk, T.P., Endringer, D.C., Scherer, R., Fronza, M., 2019. In vitro anti-inflammatory activity of terpenes via suppression of superoxide and nitric oxide generation and the NF- κ B signalling pathway. *Inflammopharmacology* 27, 281–289. <https://doi.org/10.1007/s10787-018-0483-z>
- Martin, W.J.J.M., Forouzanfar, T., 2011. The efficacy of anticonvulsants on orofacial pain: A systematic review. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology* 111, 627–633. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2011.01.033>
- Martin, W.J.J.M., Perez, R.S.G.M., Tuinzing, D.B., Forouzanfar, T., 2012. Efficacy of antidepressants on orofacial pain: A systematic review. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 41, 1532–1539. <https://doi.org/10.1016/j.ijom.2012.09.001>

- Mehta, P., McAuley, D.F., Brown, M., Sanchez, E., Tattersall, R.S., Manson, J.J., HLH Across Speciality Collaboration, UK, 2020. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet* 395, 1033–1034. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30628-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30628-0)
- Melo Júnior, J. de M. de A. de, Damasceno, M. de B.M.V., Santos, S.A.A.R., Barbosa, T.M., Araújo, J.R.C., Vieira-Neto, A.E., Wong, D.V.T., Lima-Júnior, R.C.P., Campos, A.R., 2017. Acute and neuropathic orofacial antinociceptive effect of eucalyptol. *Inflammopharmacology* 25, 247–254. <https://doi.org/10.1007/s10787-017-0324-5>
- Melo, L.T., Panchalingam, V., Cherkas, P., Campos, A.R., Avivi-Arber, L., Sessle, B.J., 2019. (-)- α -Bisabolol reduces nociception and trigeminal central sensitisation in acute orofacial neuropathic pain induced by infraorbital nerve injury. *Life Sci.* 227, 122–128. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.04.032>
- Melo, M. S. et. al. Antinociceptive effect of citronellal in mice. *Pharmaceutical Biology*, v. 48, n. 4, p. 411-416, 2010.
- Meng, I.D., Hu, J.W., Benetti, A.P., Bereiter, D.A., 1997. Encoding of corneal input in two distinct regions of the spinal trigeminal nucleus in the rat: cutaneous receptive field properties, responses to thermal and chemical stimulation, modulation by diffuse noxious inhibitory controls, and projections to the parabrachial area. *J. Neurophysiol.* 77, 43–56. <https://doi.org/10.1152/jn.1997.77.1.43>
- Merskey, H. et al. Pain terms: a list with definitions and notes on usage. *Pain*, v. 6, n. 3, p. 249-252, 1979.
- Michot, B., Kayser, V., Hamon, M., Bourgoin, S., 2015. CGRP receptor blockade by MK-8825 alleviates allodynia in infraorbital nerve-ligated rats. *Eur J Pain* 19, 281–290. <https://doi.org/10.1002/ejp.616>
- Morrone L.A. Et Al. Opioids Resistance in Chronic Pain Management. *Curr Neuropharmacol.* n.15 p. 444-456, 2017.
- Mukhtar, Y.M., Adu-Frimpong, M., Xu, X., Yu, J., 2018. Biochemical significance of limonene and its metabolites: future prospects for designing and developing highly potent anticancer drugs. *Biosci. Rep.* 38. <https://doi.org/10.1042/BSR20181253>
- Mura, P. Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in aqueous solution: A review. *Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis*, v. 101, p.238-250, dez. 2014.
- Murali, R.; Saravanan, R. Antidiabetic effect of d-limonene, a monoterpene in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biomedicine & Preventive Nutrition*, v. 2, n. 4, p. 269–275, 2012.
- Ohbuchi, K., Mori, Y., Ogawa, K., Warabi, E., Yamamoto, M., Hirokawa, T., 2016. Detailed Analysis of the Binding Mode of Vanilloids to Transient Receptor Potential Vanilloid Type I (TRPV1) by a Mutational and Computational Study. *PLoS One* 11, e0162543. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162543>

- Okeson, J.P., 2008. The Classification of Orofacial Pains. *Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America* 20, 133–144. <https://doi.org/10.1016/j.coms.2007.12.009>
- Parasuraman, S., Raveendran, R., Kesavan, R., 2010. Blood sample collection in small laboratory animals. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics* 1, 87–93. <https://doi.org/10.4103/0976-500X.72350>
- Patapoutian, A., Tate, S., Woolf, C.J., 2009. Transient receptor potential channels: targeting pain at the source. *Nat Rev Drug Discov* 8, 55–68. <https://doi.org/10.1038/nrd2757>
- Piccinelli, A.C., Morato, P.N., Dos Santos Barbosa, M., Croda, J., Sampson, J., Kong, X., Konkiewitz, E.C., Ziff, E.B., Amaya-Farfan, J., Kassuya, C.A.L., 2017. Limonene reduces hyperalgesia induced by gp120 and cytokines by modulation of IL-1 β and protein expression in spinal cord of mice. *Life Sci.* 174, 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.11.017>
- Pryde, D.C., Marron, B.E., West, C.W., Reister, S., Amato, G., Yoger, K., Antonio, B., Padilla, K., Cox, P.J., Turner, J., Warmus, J.S., Swain, N.A., Omoto, K., Mahoney, J.H., Gerlach, A.C., 2017. Discovery of a Series of Indazole TRPA1 Antagonists. *ACS Med Chem Lett* 8, 666–671. <https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.7b00140>
- Quintans, J.S.S., Antonioli, Â.R., Almeida, J.R.G.S., Santana-Filho, V.J., Quintans-Júnior, L.J., 2014. Natural products evaluated in neuropathic pain models - a systematic review. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology* 114, 442–450. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12178>
- Quintans, J.S.S., Shanmugam, S., Heimfarth, L., Araújo, A.A.S., Almeida, J.R.G. da S., Picot, L., Quintans-Júnior, L.J., 2019. Monoterpenes modulating cytokines - A review. *Food and Chemical Toxicology* 123, 233–257. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.10.058>
- Raboisson, P., Dallel, R., 2004. The orofacial formalin test. *Neurosci Biobehav Rev* 28, 219–226. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2003.12.003>
- Ravichandran, C., Badgujar, P.C., Gundev, P., Upadhyay, A., 2018. Review of toxicological assessment of d-limonene, a food and cosmetics additive. *Food Chem. Toxicol.* 120, 668–680. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.07.052>
- Ren, L., Jing, J., Chen, G., Miao, Y., Wei, P., 2014. Preparation, characteristic and pharmacological study on inclusion complex of sulfobutylether- β -cyclodextrin with glaucocalyxin A. *J. Pharm. Pharmacol.* 66, 927–934. <https://doi.org/10.1111/jphp.12219>
- Romero-Reyes, M., Uyanik, J.M., 2014a. Orofacial pain management: Current perspectives. *Journal of Pain Research* 7, 99–115. <https://doi.org/10.2147/JPR.S37593>
- Rossi, H.L., Jenkins, A.C., Kaufman, J., Bhattacharyya, I., Caudle, R.M., Neubert, J.K., 2012. Characterization of bilateral trigeminal constriction injury using an operant facial pain assay. *Neuroscience* 224, 294–306. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.08.015>

- Roveroni, R.C., Parada, C.A., Cecília, M., Veiga, F.A., Tambeli, C.H., 2001. Development of a behavioral model of TMJ pain in rats: the TMJ formalin test. *Pain* 94, 185–191. [https://doi.org/10.1016/s0304-3959\(01\)00357-8](https://doi.org/10.1016/s0304-3959(01)00357-8)
- Rufino, A.T., Ribeiro, M., Sousa, C., Judas, F., Salgueiro, L., Cavaleiro, C., Mendes, A.F., 2015. Evaluation of the anti-inflammatory, anti-catabolic and pro-anabolic effects of E-caryophyllene, myrcene and limonene in a cell model of osteoarthritis. *Eur. J. Pharmacol.* 750, 141–150. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.01.018>
- Santos, P.L., Brito, R.G., Oliveira, M.A., Quintans, J.S.S., Guimarães, A.G., Santos, M.R.V., Menezes, P.P., Serafini, M.R., Menezes, I.R.A., Coutinho, H.D.M., Araújo, A.A.S., Quintans-Júnior, L.J., 2016. Docking, characterization and investigation of β -cyclodextrin complexed with citronellal, a monoterpene present in the essential oil of *Cymbopogon* species, as an anti-hyperalgesic agent in chronic muscle pain model. *Phytomedicine* 23, 948–957.
- Santos, P.L., Brito, R.G., Quintans, J.S.S., Araujo, A.A.S., Menezes, I.R.A., Brogden, N.K., Quintans-Junior, L.J., 2017. Cyclodextrins as Complexation Agents to Improve the Anti-inflammatory Drugs Profile: a Systematic Review and Meta-Analysis. *Curr. Pharm. Des.* 23, 2096–2107. <https://doi.org/10.2174/1381612823666170126121926>
- Sarlani, E., Balciunas, B.A., Grace, E.G., 2005. Orofacial Pain—Part II. *AACN Clinical Issues: Advanced Practice in Acute and Critical Care* 16, 347–358. <https://doi.org/10.1097/00044067-200507000-00008>
- Silva, J.C., Almeida, J.R.G.S., Quintans, J.S.S., Gopalsamy, R.G., Shanmugam, S., Serafini, M.R., Oliveira, M.R.C., Silva, B.A.F., Martins, A.O.B.P.B., Castro, F.F., Menezes, I.R.A., Coutinho, H.D.M., Oliveira, R.C.M., Thangaraj, P., Araújo, A.A.S., Quintans-Júnior, L.J., 2016. Enhancement of orofacial antinociceptive effect of carvacrol, a monoterpene present in oregano and thyme oils, by β -cyclodextrin inclusion complex in mice. *Biomed. Pharmacother.* 84, 454–461. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.09.065>
- Siqueira-Lima, P.S., Quintans, J.S.S., Heimfarth, L., Passos, F.R.S., Pereira, E.W.M., Rezende, M.M., Menezes-Filho, J.E.R., Barreto, R.S.S., Coutinho, H.D.M., Araújo, A.A.S., Medrado, A.S., Naves, L.A., Bomfim, H.F., Lucchese, A.M., Gandhi, S.R., Quintans-Júnior, L.J., 2019. Involvement of the PKA pathway and inhibition of voltage gated Ca^{2+} channels in antihyperalgesic activity of *Lippia grata*/ β -cyclodextrin. *Life Sci.* 239, 116961. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116961>
- Siqueira-Lima, P.S., Silva, J.C., Quintans, J.S.S., Antonioli, A.R., Shanmugam, S., Barreto, R.S.S., Santos, M.R.V., Almeida, J.R.G.S., Bonjardim, L.R., Menezes, I.R.A., Quintans-Júnior, L.J., 2017. Natural products assessed in animal models for orofacial pain – a systematic review. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 27, 124–134. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2016.06.005>

- Somensi, N., Rabelo, T.K., Guimarães, A.G., Quintans-Junior, L.J., de Souza Araújo, A.A., Moreira, J.C.F., Gelain, D.P., 2019. Carvacrol suppresses LPS-induced pro-inflammatory activation in RAW 264.7 macrophages through ERK1/2 and NF- κ B pathway. *Int. Immunopharmacol.* 75, 105743. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.105743>
- Sommer, C., 2002. Pharmakologische behandlung orofazialer schmerzen. *Schmerz* 16, 381–388. <https://doi.org/10.1007/s004820200003>
- Souza, G.R., Cunha, T.M., Silva, R.L., Lotufo, C.M., Verri, W.A., Funez, M.I., Villarreal, C.F., Talbot, J., Sousa, L.P., Parada, C.A., Cunha, F.Q., Ferreira, S.H., 2015. Involvement of nuclear factor kappa B in the maintenance of persistent inflammatory hypernociception. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 134, 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2015.04.005>
- Sun, J., 2007. D-Limonene: safety and clinical applications. *Altern Med Rev* 12, 259–264.
- Terenzi, R., Romano, E., Manetti, M., Peruzzi, F., Nacci, F., Matucci-Cerinic, M., Guiducci, S., 2013. Neuropeptides activate TRPV1 in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes and foster IL-6 and IL-8 production. *Ann. Rheum. Dis.* 72, 1107–1109. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2012-202846>
- Thatiparti, T.R., von Recum, H.A., 2010. Cyclodextrin complexation for affinity-based antibiotic delivery. *Macromol Biosci* 10, 82–90. <https://doi.org/10.1002/mabi.200900204>
- Tjølsen, A., Berge, O.G., Hunskaar, S., Rosland, J.H., Hole, K., 1992. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 51, 5–17. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(92\)90003-t](https://doi.org/10.1016/0304-3959(92)90003-t)
- Trevisan, G., Benemei, S., Materazzi, S., De Logu, F., De Siena, G., Fusi, C., Fortes Rossato, M., Coppi, E., Marone, I.M., Ferreira, J., Geppetti, P., Nassini, R., 2016. TRPA1 mediates trigeminal neuropathic pain in mice downstream of monocytes/macrophages and oxidative stress. *Brain* 139, 1361–1377. <https://doi.org/10.1093/brain/aww038>
- Vieira, A.J., Beserra, F.P., Souza, M.C., Totti, B.M., Rozza, A.L., 2018. Limonene: Aroma of innovation in health and disease. *Chemico-Biological Interactions* 283, 97–106. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.02.007>
- Worsley, D.J., Marshman, Z., Robinson, P.G., Jones, K., 2016. Ethnic Disparities in Oral Health Related Quality of Life among Adults in London, England. *Community dental health* 33, 9–14. <https://doi.org/10.1922/CDH>
- Wyatt, T.A., Poole, J.A., Nordgren, T.M., DeVasure, J.M., Heires, A.J., Bailey, K.L., Romberger, D.J., 2014. cAMP-dependent protein kinase activation decreases cytokine release in bronchial epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 307, L643–651. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00373.2013>

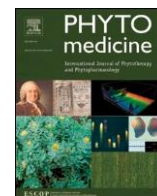
- Xia, L., Liu, M.-X., Zhong, J., Dou, N.-N., 2019. Pain threshold monitoring during chronic constriction injury of the infraorbital nerve in rats. *Br J Neurosurg* 33, 409–412.
<https://doi.org/10.1080/02688697.2018.1538483>
- Xie, H.-Y., Xu, F., Li, Y., Zeng, Z.-B., Zhang, R., Xu, H.-J., Qian, N.-S., Zhang, Y.-G., 2015. Increases in PKC gamma expression in trigeminal spinal nucleus is associated with orofacial thermal hyperalgesia in streptozotocin-induced diabetic mice. *J. Chem. Neuroanat.* 63, 13–19.
<https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2014.12.001>
- Yan, Z., Xu, W., Sun, J., Liu, X., Zhao, Y., Sun, Y., Zhang, T., He, Z., 2008. Characterization and in vivo evaluation of an inclusion complex of oridonin and 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *Drug Dev Ind Pharm* 34, 632–641. <https://doi.org/10.1080/03639040701834078>
- Yang, F., Zheng, J., 2017. Understand spiciness: mechanism of TRPV1 channel activation by capsaicin. *Protein Cell* 8, 169–177. <https://doi.org/10.1007/s13238-016-0353-7>
- IGIMI, H. et al. A useful cholesterol solvent for medical dissolution of gallstones. *Gastroenterol Jpn*, v. 27, n. 4, p. 536-45, Aug 1992.
- PASSOS, G. F. et. al. Antiinflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 110, p. 323-333, 2007.
- PEIXOTO, A. L.; MORIM, M. P. Coleções botânicas: documentação da biodiversidade brasileira. *Ciência e Cultura*, v. 55, n. 3, p. 21 - 24, 2003.
- PINTO, A. C. et al. Produtos Naturais: Atualidades, Desafios e Perspectivas. *Química Nova*, v. 25, n.1, p. 45 - 61, 2002.
- QUINTANS, J.S.S, et. al. Improvement of p-cymene antinociceptive and anti-inflammatory effects by inclusion in β -cyclodextrin. *Phytomedicine*. v. 20, p. 436-440, 2013.
- RAMADABRAN, K.; BANSINATH, M. A critical analysis of the experimental evaluation of nociceptive reactions in animals. *Pharmac. Res.* v. 3, n. 1, p. 263-269, 1996.
- ROZZA, A. L. et. al. Gastroprotective mechanisms of Citrus lemon (Rutaceae) essential oil and its majority compounds limonene and -pinene: Involvement of heat-shock protein-70, vasoactive intestinal peptide, glutathione, sulfhydryl compounds, nitric oxide and prostaglandin E2. *Chemico-Biological Interactions*, n. 189, p. 82–89, 2011.
- SERAFINI, M.R. et. al. Interaction of p-cymene with beta-cyclodextrin. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. v. 109, p. 951–955, 2012.
- VIEGAS JUNIOR, BOLZANI, BARREIRO, Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Química Nova*, v. 29, n. 2, p.326-337, abr. 2006.

- VIGUSHIN, D. M. et al. Phase I and pharmacokinetic study of D-limonene in patients with advanced cancer. Cancer Research Campaign Phase I/II Clinical Trials Committee. Cancer Chemother Pharmacol, v. 42, n. 2, p. 111-7, 1998.
- WHYSNER, J.; WILLIAMS, G. M. d-limonene mechanistic data and risk assessment: absolute species-specific cytotoxicity, enhanced cell proliferation, and tumor promotion. Pharmacol Ther, v. 71, n. 1-2, p. 127-36, 1996.
- WODA A., et al. Towards a new taxonomy of idiopathic orofacial pain. Pain. n. 116, p. 396-406, 2005.
- WOOLF C.J., MANNION R.J. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. Lancet. n. 353 p. 1959-64, 1999.
- YOON, W. J.; LEE, N. H.; HYUN, C. G. Limonene suppresses lipopolysaccharide-induced production of nitric oxide, prostaglandin E2, and pro-inflammatory cytokines in RAW 264.7 macrophages. J Oleo Sci, v. 59, n. 8, p. 415-21, 2010.
- Zhu, D., Li, C., Zhang, J., Liu, H., 2012. [Effect of orofacial inflammatory pain on p38 mitogen-activated protein kinase activation in trigeminal caudal nucleus of rats]. Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi 47, 14–18. <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.1002-0098.2012.01.005>
- Zhu, Y., Xu, W., Zhang, J., Liao, Y., Firempong, C.K., Adu-Frimpong, M., Deng, W., Zhang, H., Yu, J., Xu, X., 2019. Self-microemulsifying Drug Delivery System for Improved Oral Delivery of Limonene: Preparation, Characterization, in vitro and in vivo Evaluation. AAPS PharmSciTech 20, 153. <https://doi.org/10.1208/s12249-019-1361-8>
- ZORE, G. B. et. al. Terpenoids inhibit Candida albicans growth by affecting membrane integrity and arrest of cell cycle. Phytomedicine, v. 18, p. 1181– 1190, 2011.

ANEXOS

7. ANEXOS

Segue anexo versão digital aceito em 11 de dezembro de 2021, disponível on-line em 18 de dezembro de 2021, versão do registro em 10 de janeiro de 2022. Publicado na Phytomedicine, com fator de impacto 5.340.



Limonene, a citrus monoterpene, non-complexed and complexed with hydroxypropyl- β -cyclodextrin attenuates acute and chronic orofacial nociception in rodents: Evidence for involvement of the PKA and PKC pathway

Erik W.M. Pereira^{a,b}, Luana Heimfarth^a, Tiffany KB. Santos^a, Fabiolla R.S. Passos^{a,b}, Pollyana Siqueira-Lima^c, Luciana Scotti^d, Marcus T. Scotti^d, Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida^e, Adriana R. Campos^f, Henrique D.M. Coutinho^{g,*}, Patrick Martin^h, Lucindo J. Quintans-Júnior^{a,b}, Jullyana S.S. Quintans^{a,b}

^a Department of Physiology, Laboratory of Neuroscience and Pharmacological Assays (LANEF), Federal University of Sergipe, São Cristóvão, SE, Brazil

^b Health Sciences Graduate Program (PPGCS), Federal University of Sergipe, Aracaju, SE, Brazil

^c College of Science and Technology, Feira de Santana, BA, Brazil

^d Federal University of Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil

^e Federal University of Vale do São Francisco, Petrolina, PE, Brazil

^f Experimental Biology Centre (NUBEX), University of Fortaleza, Fortaleza, CE, Brazil

^g Regional University of Cariri, Crato-E, Brazil

^h Univ Artois, UniLaSalle, Unité Transformations & Agroressources, Béthune, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Chronic orofacial pain

Monoterpene

Limonene

Hydroxypropyl- β -cyclodextrin

ABSTRACT

Background: Chronic orofacial pain is a serious public health problem with a prevalence of 7–11% in the population. This disorder has different etiologies and characteristics that make pharmacological treatment difficult. Natural products have been shown to be a promising source of treatments for the management of chronic pain, as an example the terpenes.

Purpose: The aim of this study was to evaluate the anti-nociceptive and anti-inflammatory effects of one of these terpenes, d-limonene (LIM - a common monoterpene found in citrus fruits) alone and complexed with hydroxypropyl- β -cyclodextrin (LIM/HP β CD) in preclinical animal models.

Methods: Orofacial pain was induced by the administration of hypertonic saline on the corneal surface, the injection of formalin into the temporomandibular joint (TMJ), or chronic constriction injury of the infraorbital nerve (CCI-IoN). The study used male Wistar rats and Swiss mice treated with LIM (50 mg/kg), LIM/HP β CD (50 mg/kg), vehicle (control), gabapentin or morphine, and eyes wiping (induced by hypertonic saline), face rubbing (formalin-induced in TMJ) or mechanical hyperalgesia (provoked by CCI-IoN) were assessed. Additionally, ELISA was used to measure TNF- α , and western blot analysis to assess levels of PKA α , NF κ B, p38MAPK and phosphorylated PKC substrates. Serum levels of aspartate aminotransferase (AST) and alanine transferase (ALT) were also evaluated.

Results: LIM and LIM/HP β CD significantly reduced ($p < 0.001$) corneal nociception and formalin-induced TMJ nociception. In addition, both substances attenuated ($p < 0.001$) mechanical hyperalgesia in the CCI-IoN model. The antinociceptive effect induced by LIM and HP β CD/LIM was associated with decreased TNF- α levels, downregulation of the NF κ B and p38MAPK signalling pathways and reduced PKC substrate phosphorylation and PKA immunocontent. Moreover, the results demonstrated that complexation with HP β CD was able to decrease the therapeutic dose of LIM.

Conclusion: LIM was found to be a promising molecule for the treatment of orofacial pain due to its capacity to modulate some important mediators essential to the establishment of pain, and HP β CD can be a key tool to improve the profile of LIM.

* Corresponding author.

E-mail address: hdmcoutinho@gmail.com (H.D.M. Coutinho).

<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2021.153893>

Received 21 August 2021; Received in revised form 5 December 2021; Accepted 11 December 2021

Available online 18 December 2021

0944-7113/© 2021 Elsevier GmbH. All rights reserved.