

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

**EFEITO ANTINOCICEPTIVO OROFACIAL DO
DERIVADO 2-AMINO-TIOFENO 7CN03 E SEUS
POSSÍVEIS ALVOS DE AÇÃO**

Alleson Jamesson da Silva

SAPIENTIA AEDIFICAT

2024

ALLESON JAMESSON DA SILVA

EFEITO ANTINOCICEPTIVO OROFACIAL DO DERIVADO 2-AMINO-TIOFENO 7CN03 E SEUS POSSÍVEIS ALVOS DE AÇÃO

OROFACIAL ANTINOCICEPTIVE EFFECT OF THE 2-AMINO-THIOPHENE DERIVATIVE 7CN03 AND ITS POSSIBLE TARGETS OF ACTION

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia – Área de Concentração Ciências Odontológicas.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Dias de Castro
Coorientadora: Prof.^a. Dr.^a Adriana Maria Fernandes de Oliveira Golzio

João Pessoa
2024

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S586e Silva, Alleson Jamesson da.
Efeito antinociceptivo orofacial do derivado
2-amino-tiofeno 7CN03 e seus possíveis alvos de ação /
Alleson Jamesson da Silva. - João Pessoa, 2024.
58 f. : il.

Orientação: Ricardo Dias de Castro.
Coorientação: Adriana Maria Fernandes de Oliveira
Golzio.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Odontologia - Dor facial. 2. Analgésicos. 3.
Tratamento da dor. 4. Derivado tiofênico. 5. Modelos
animais. I. Castro, Ricardo Dias de. II. Golzio,
Adriana Maria Fernandes de Oliveira. III. Título.

UFPB/BC

CDU 616.314(043)



ATA DA DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

2024

Aos dezenove dias do mês de dezembro do ano de 2024, às 10:00 horas, na Sala de reuniões do Laboratório de Psicofarmacologia do IPFarm, reuniram-se os membros da banca examinadora composta pelas professores doutores: Ricardo Dias de Castro (Orientador(a) e Presidente), Adriana Maria Fernandes de Oliveira Golzio (Coorientador), Aníbal Henrique Barbosa Luna (membro interno ao Programa de Pós-graduação em Odontologia – UFPB) e Jéssica Cabral de Andrade (membro externo ao Programa de Pós-graduação em Odontologia – UFPB) a fim de arguirm o(a) mestrando(a) Alleson Jamesson da Silva, com relação ao seu trabalho final de curso de mestrado (dissertação), sob o título “EFEITO ANTINOCICEPTIVO OROFACIAL DO DERIVADO 2-AMINOTIOFENO 7CN03 E SEUS POSSÍVEIS ALVOS DE AÇÃO”. Aberta a sessão pelo presidente da mesma, coube o(a) candidato(a), na forma regimental, expor o tema de sua dissertação, dentro do tempo regulamentar. Em seguida, foi questionado pelos membros da banca examinadora, sendo as explicações necessárias fornecidas e as modificações solicitadas registradas. Logo após, os membros da banca examinadora reuniram-se em sessão secreta, tendo chegado ao seguinte julgamento, que, de público, foi anunciado: 1º Examinador (membro externo): Conceito “Aprovado”; 2º Examinador (membro externo): Conceito “Aprovado”, 3º Examinador (Coorientador): Conceito “Aprovado”, 4º Examinador (Orientador e presidente): Conceito “Aprovado”. O que resultou em conceito final igual: “APROVADO”, o que permite o(a) candidato(a) fazer jus ao título de Mestre em Odontologia. Os documentos utilizados para avaliação da candidata durante o processo aqui descrito apresentam-se como prova documental do mesmo e, como tal, serão anexadas a esta ata para arquivamento. Nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente ata, que será assinada pelo presidente, pelos demais membros da banca e pelo(a) candidato (a).

Jéssica Cabral de Andrade

1º Examinador – Membro Externo

Aníbal Luna

2º Examinador – Membro interno

Adriana Maria Fernandes de Oliveira Golzio

3º Examinador – Coorientador

Ricardo Dias de Castro

4º Examinador – Presidente

Alleson Jamesson da Silva

Candidato (a)

A Deus, pela sua infinita bondade e proteção,
guiando todos os meus passos e a minha família,
por todo amor e incentivo de sempre, *dedico*.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por se mostrar sempre presente em minha vida, me guiando pelos melhores caminhos e me dando forças para superar os desafios.

Agradeço a minha família, em especial a minha mãe, Arlana Gomes, o meu exemplo de mulher no mundo, que por anos superou com maestria o desafio da maternidade solo, proporcionando a mim e ao meu irmão, amor e educação na forma mais digna que um indivíduo possa receber.

Ao meu pai (*in memoriam*), Lameque Rodrigues, por apoderar-se da paternidade de forma tão genuína, por estar ao meu lado diante de momentos tão importantes da minha vida, me dando todo o apoio necessário, sei que está orgulhoso onde estiver.

Ao meu irmão, Allan Silva, pela irmandade e motivação de sempre.

Ao meu companheiro de vida, Wallber Moreno, por ser tudo que eu preciso nos momentos felizes e difíceis, pela paciência, apoio e motivação.

A minha amiga, Raissa Guedes, que mesmo longe não deixa de deixar claro o quanto a nossa irmandade é forte, obrigado pela injeção de autoestima de sempre.

Aos colegas do PPGO, em especial Palloma Costa, Beatriz Barros e Raiana Gurgel. Tudo ficou mais fácil com vocês.

Aos colegas do Grupo de Pesquisa em Farmacologia e Terapêutica em Odontologia da UFPB, Pablo Raiff e todos da Psicofarmacologia, minha gratidão pelo imenso apoio necessário para a realização desta pesquisa.

Aos meus orientadores, Ricardo Dias de Castro e Adriana Maria Fernandes de Oliveira Golzio por serem exemplos de humanidade, competência e por me permitir internalizar mais admiração pela docência e pesquisa durante minha passagem pelo mestrado.

A instituição, UFPB e o Programa de Pós Graduação em Odontologia por ter me acolhido e possibilitado a concretização desse título.

A Capes e CNPq pelo financiamento de todo esse trabalho.

A todos, o meu muito obrigado!

*“Sedare dolorem opus divinum est –
Amenizar a dor é obra divina”
Hipócrates 400 a.C.*

RESUMO

A dor na região orofacial compromete a qualidade de vida, e as terapias atuais, limitadas em eficácia e com efeitos adversos, impulsionam a busca por novos tratamentos. Os derivados tiofênicos possuem propriedades terapêuticas notáveis, entre elas antinociceptiva e anti-inflamatória, e estudos recentes mostram atividade superior a medicamentos comerciais, destacando sua importância na concepção de novos agentes. Este estudo investigou o efeito antinociceptivo do derivado tiofênico 2-[(4-dietilamino-benzilideno)-amino]-5,6,7,8-tetra-hidro-4H-ciclohepta[b]tiofeno-3-carbonitrila (7CN03) e seus possíveis mecanismos ação. Em testes *in vivo* com camundongos machos (n = 6 por grupo), a nocicepção foi induzida por formalina, capsaicina e glutamato, uma hora após o tratamento, e a fricção facial serviu como parâmetro para medir o comportamento nociceptivo. No teste *in silico* de *docking molecular*, as estruturas cristalográficas de seis alvos envolvidos na fisiopatologia da dor foram selecionadas e comparadas com agonistas (receptores opioides) ou antagonistas (TRPV1, TRPA1 e NMDAR) de cada um dos alvos. O software Molegro Virtual Docker foi utilizado para realizar o docking molecular e a etapa de redocking foi realizada a partir do *Root-Mean-Square Deviation*. O 7CN03, em diferentes doses (1 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,01 mg/kg), apresentou ação significativa na fase neurogênica no teste de formalina, reduzindo o comportamento nociceptivo em até 56%. Na fase inflamatória, a dose de 1 mg/kg promoveu efeito antinociceptivo, com redução do comportamento nociceptivo em 32% (p < 0,05). No teste com glutamato, o 7CN03 bloqueou a nocicepção em até 90% (p < 0,001), e no teste com capsaicina, reduziu o comportamento nociceptivo em até 74%. Estudos de docking molecular indicaram predição de maior afinidade do 7CN03 com os receptores μ -opioide (-97,00 Kcal/mol), TRPV1 (-87,79 Kcal/mol) e NMDA (-104,86 Kcal/mol) quando comparado com os ligantes cocrystalizados. Os achados sugerem que o derivado tiofênico avaliado apresenta efeito antinociceptivo orofacial, com predição mecanismo de ação por envolvimento de receptores opióides, de potencial transitório vanilóide e glutamatérgico.

Palavras-chave: Dor facial. Analgésicos. Tratamento da dor. Derivado tiofênico. Modelos animais.

ABSTRACT

Orofacial pain impairs quality of life, and current therapies, limited in efficacy and associated with adverse effects, drive the search for new treatments. Thiophene derivatives exhibit remarkable therapeutic properties, including antinociceptive and anti-inflammatory activities, with recent studies demonstrating superior activity compared to commercial drugs, highlighting their relevance in the design of novel agents. This study investigated the antinociceptive effect of the thiophene derivative 2-[(4-diethylamino-benzylidene)-amino]-5,6,7,8-tetrahydro-4H-cyclohepta[b]thiophene-3-carbonitrile (7CN03) and its possible mechanisms of action. In vivo tests were performed on male mice (n = 6 per group), with nociception induced by formalin, capsaicin, and glutamate one hour after treatment. Facial rubbing was used as a parameter to measure nociceptive behavior. In the in silico molecular docking test, the crystallographic structures of six targets involved in the pathophysiology of pain were selected and compared with agonists (opioid receptors) or antagonists (TRPV1, TRPA1, and NMDAR) for each of the targets. The Molegro Virtual Docker software was used to perform the molecular docking, and the redocking step was carried out based on the *Root-Mean-Square Deviation*. At different doses (1 mg/kg, 0.1 mg/kg, 0.01 mg/kg), 7CN03 exhibited significant action during the neurogenic phase of the formalin test, reducing nociceptive behavior by up to 56%. During the inflammatory phase, the 1 mg/kg dose exerted an antinociceptive effect, reducing nociceptive behavior by 32% ($p < 0.05$). In the glutamate test, 7CN03 blocked nociception by up to 90% ($p < 0.001$), and in the capsaicin test, it reduced nociceptive behavior by up to 74%. Molecular docking studies predicted higher binding affinity of 7CN03 for μ -opioid (-97.00 Kcal/mol), TRPV1 (-87.79 Kcal/mol), and NMDA (-104.86 Kcal/mol) receptors when compared with the cocrystallized ligands. The findings suggest that the evaluated thiophene derivative exhibits an orofacial antinociceptive effect, with a predicted mechanism of action involving opioid, transient vanilloid potential, and glutamatergic receptors.

Keywords: Facial pain. Analgesics. Pain management. Thiophene derivative. Animal models.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINES: Anti-inflamatórios não esteroides

AMPA: Ácido 2-amino-3-(3-hidroxi-5-metil-isoxazol-4-il) propanoico

AMPc: Adenosina Monofosfato cíclico

COX: Cicloxigenase

DP: Desvio padrão

GT: Glânglios Trigeminais

i.p: intraperitoneal

IASP: Associação Internacional para Estudo da Dor

IPFarm: Instituto de Pesquisa em Medicamentos e Fármacos

LSMV: Laboratório de Síntese e Vetorização Molecular

mGluRs: Receptores Metabotrópicos de Glutamato

NaCl: Cloreto de Sódio

NMDA: N-metil-D-Aspartato

ON: Óxido Nítrico

PDB: Protein Data Bank

PGE2: Prostaglandina E2

RSMD: Root-Mean-Square Deviation

SBED: Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor

SNC: Sistema Nervoso Central

TRP: Receptor de Potencial Transitório

TRPA1: Receptor de Potencial Transitório Anquirina 1

TRPV1: Receptor de Potencial Transitório Vanilóide 1

v.o: via oral

7CN03: 2-[(4-dietilamino-benzilideno)-amino]-5,6,7,8-tetra-hidro-4H-ciclohepta[b]tiofeno-3-carbonitrila

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 2 |
| 2.1. Dor e Nocicepção | 2 |
| 2.2. Mecanismos periféricos da dor | 4 |
| 2.2.1. Receptores opioides | 5 |
| 2.2.2. Receptores de potencial transitório | 6 |
| 2.2.3. Receptores glutamatérgicos | 7 |
| 2.3. Dor orofacial | 9 |
| 2.3.1. Terapias atuais no tratamento da dor orofacial | 9 |
| 2.4. Derivados tiofênicos | 10 |
| 2.5. Docking Molecular | 11 |
| 3. OBJETIVOS | 13 |
| 4. ARTIGO | 14 |
| 5. CONCLUSÃO | 43 |
| 6. REFERÊNCIAS | 44 |
| 7. ANEXO | 49 |

1. INTRODUÇÃO

A dor orofacial é comumente citada como uma comorbidade da cavidade oral ou face e se caracteriza pela presença da dor nos tecidos moles e/ou mineralizados (Matsuka, 2022). Sua etiologia pode ser de origem odontogênica ou não odontogênica, esta última de difícil diagnóstico, acometendo músculos, articulações e nervos, bem como pode estar associada a cefaleia, cervicalgia e doenças reumáticas, como fibromialgia e artrite reumatoide (Matsuka, 2022; Shaefer et al., 2018). Diante dessa complexidade, a dor orofacial é considerada um dos problemas mais graves de saúde em todo o mundo, e muitos pacientes não conseguem encontrar métodos eficazes de tratamento (Joury et al., 2018).

A prevalência de dor na região orofacial é de 30,2% em países em desenvolvimento, parcela importante da população que pode ter a qualidade de vida impactada diante das repercussões biológicas desse problema, pois está associado a limitação funcional e desconforto psicológico (Ananthan e Benliel, 2020).

Distintivamente do sistema espinhal, a condução de impulsos nociceptivos através dos nervos trigêmeos é realizada por órgãos não localizados em outras partes do corpo e representa um nível particular da região facial (Beirith et al., 2002). A singularidade do sistema trigeminal é a integração das entradas nociceptivas em mais de um nível, ou seja, no tronco cerebral, no subnúcleo caudal e nos outros componentes do complexo nuclear trigeminal, que também processam as propriedades do toque epicrítico e da propriocepção da face (Hargreaves, 2011).

As terapias atuais para o tratamento da dor orofacial incluem o uso de analgésicos ou anti-inflamatórios, sejam eles não-esteroidais ou esteroidais. Entretanto, não existe um medicamento ideal para tratar o complexo orofacial, uma vez que os medicamentos atualmente empregados têm o seu uso limitado ou interrompido em consequência de efeitos adversos como distúrbios gastrointestinais, hepáticos e renais ou reações de hipersensibilidade (Bindu et al., 2020). Quando se considera os opióides em particular, a tolerância e dependência farmacológica, responsáveis por altas taxas de morbidade e mortalidade em países desenvolvidos, tornando-se evidente a necessidade de doses menores ou mesmo

substituição dessa classe de medicamentos por outros agentes (Upp e Waljee, 2020).

Os Anti-inflamatórios não esteroides (AINES) comerciais, a exemplo da tinoridina e ácido tiaprofênico (usado especialmente para o tratamento da dor artrítica), contêm um anel tiofênico (Cruz et al., 2020). Estudos recentes mostram a importância deste anel, onde o mesmo serve como base para o desenvolvimento de drogas e na descoberta de novos agentes anti-inflamatórios. A grande maioria de seus derivados planejados e sintetizados apresentam atividade anti-inflamatória superior aos AINEs de referência, conforme demonstrado em ensaios *in vitro*, *in silico* e *in vivo* (Cruz et al., 2021; Cruz et al., 2020; Mota et al., 2018).

Nesse contexto, o derivado tiofênico 2-[(4-dietilamino-benzilideno)-amino]-5,6,7,8-tetra-hidro-4H-ciclohepta[b]tiofeno-3-carbonitrila (7CN03) se destaca como um agente promissor para o tratamento da dor orofacial, visto que nossos estudos anteriores demonstraram atividade analgésica no sistema espinhal. Em dados ainda não publicados, descobrimos que o 7CN03 apresentou efeito antinociceptivo em doses de 1 mg/kg, 0,1 mg/kg e 0,01 mg/kg (v.o.). Esses achados sustentam a hipótese de que esse composto apresenta efeito antinociceptivo que envolve o sistema trigeminal.

O objetivo deste estudo foi investigar o efeito antinociceptivo orofacial do derivado 2-amino-tiofênico 7CN03 em camundongos usando modelos animais de nocicepção que envolvem receptores opióides, de potencial transitório (TRP) e glutamatérgicos, além de elucidar os possíveis alvos de ação da substância através de avaliação de docking molecular. Foi incorporada a hipótese nula de que o 7CN03 não tem efeito antinociceptivo orofacial em modelos animais (sem atividade periférica ou central) e que há não há correlação em escala ordinal entre diferentes concentrações de 7CN03 e substâncias controle.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Dor e Nocicepção

A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) conceitua a dor como “uma experiência sensitiva e emocional desagradável associada, ou semelhante àquela associada, a uma lesão tecidual real ou potencial” (Raja et al., 2020). Essa definição elaborada pela IASP e traduzida ao português brasileiro pela diretoria da Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor (SBED) abrange a experiência de dor em suas variadas formas, sua diversidade e complexidade, e é válida tanto para dor aguda como crônica. Nesse contexto, podemos aplicar o conceito a todas as condições de dor pela perspectiva da pessoa que sente a dor (SBED, 2020; Raja et al., 2020).

Padronizada pela medicina, a nocicepção ou algesia é a transdução, condução e processamento de sinais nervosos aferentes gerados por nociceptores estimulados, que resulta em percepção dolorosa (Fracassi, et al., 2023). Nociceptores foram propostos pela primeira vez por Sherrington (1903).

Os sinais de estímulos nocivos, aqueles que podem ou causam danos aos tecidos, podendo ser de natureza mecânica, térmica ou química, são transmitidos principalmente através de dois tipos de nervos. Em contraste com os receptores de toque e pressão, os nociceptores têm terminações nervosas livres e geralmente são de dois tipos de fibras, pequenas fibras A-delta mielinizadas e fibras C menores não mielinizadas (Fracassi, et al., 2023; Sneddon, 2018).

Assim, um processo doloroso envolve não apenas a transdução do estímulo nociceptivo, mas também o processamento cognitivo e emocional pelo cérebro, o que o torna suficientemente complexo para produzir diferentes respostas comportamentais (Raja et al., 2020).

Nesse sentido, a dor pode gerar algumas alterações que por vezes resultam em aumento da sensibilidade a estímulos não-nocivos (hiperestesia), uma resposta dolorosa exagerada a estímulos levemente nocivos (hiperalgesia) ou em uma resposta dolorosa anormal a estímulos não nocivos (alodinia). Mais comumente

encontradas em condições de dor crônica, a alodinia e a hiperalgesia resultam de alterações periféricas centrais na transmissão, modulação e integração de estímulos nociceptivos (Fracassi, et al., 2023).

Estima-se que cerca de 30% da população mundial sofra de alguma forma de dor crônica, e esses pacientes necessitam de serviços de saúde cinco vezes mais frequentemente do que o restante da população. Por esse motivo, a dor é considerada um problema de saúde pública (Cruz et al., 2020).

2.2. Mecanismos periféricos da dor

A transdução de estímulos nocivos externos e intensos despolariza as terminações periféricas dos neurônios sensoriais primários de “alto limiar”. Esses neurônios, denominados nociceptores, são de alto limiar por necessitarem de um forte estímulo, que potencialmente lesa o tecido, para despolarizar suas terminações nervosas (Golan et al., 2014).

O primeiro passo na sequência dos eventos que originam o fenômeno doloroso é a transformação dos estímulos agressivos em potenciais de ação que, das fibras nervosas periféricas, são transferidos para o sistema nervoso central. Os receptores específicos para a dor estão localizados nas terminações de fibras nervosas A-delta e C, presentes na região da face, e quando ativados, sofrem alterações na sua membrana, permitindo a deflagração de potenciais de ação (Rocha et al., 2007).

As fibras A-delta são mielinizadas e as fibras C não são mielinizadas, portanto, possuem a capacidade de transmitir estímulos dolorosos em diferentes velocidades. As primeiras transmitem o estímulo doloroso de forma rápida, enquanto as fibras C são responsáveis pela transmissão lenta da dor e algumas destas não podem ser ativadas normalmente, porém se tornam responsivas durante a inflamação (Oaklander e Nolano, 2019).

As terminações nervosas periféricas dos neurônios nociceptores respondem a estímulos térmicos, mecânicos, e sinais químicos traduzindo-os em estímulo elétrico que será transmitido ao sistema nervoso central e interpretado no córtex cerebral como dor. Alguns agentes químicos excitam diretamente as terminações nervosas periféricas (ativadores químicos), enquanto outros aumentam a

sensibilidade das terminações periféricas (agentes sensibilizadores) (Golan et al., 2014).

A maioria dos ligantes químicos conhecidos que evocam uma resposta somatossensorial se associa à ocorrência de lesão celular ou inflamação. Esses ligantes químicos incluem prótons, íons potássio, ATP, aminas, citocinas, quimiocinas, fator de crescimento neuronal e bradicinina (Golan et al., 2014).

Quando o estímulo provoca a lesão tecidual, as células lesadas liberam enzimas, que no ambiente extracelular degradam ácidos graxos de cadeia longa e dão origem à formação de cininas. Também, a ação da fosfolipase A2 na membrana celular provoca a liberação de ácido araquidônico cuja metabolização resulta em prostaglandinas, tromboxanos e prostaciclina; essas substâncias, sobretudo as prostaglandinas E₂ (PGE₂), promovem diminuição do limiar de excitabilidade dos nociceptores (Nasry e Martin, 2021).

Muitas moléculas e seus receptores foram associados à nocicepção e à dor (Sneddon, 2018). Entre os modelos animais desenvolvidos ou adaptados para o estudo da dor orofacial com agentes inflamatórios e nociceptivos estão os que envolvem o uso da formalina, capsaicina e glutamato. Esses modelos envolvem mecanismo de ação associados aos receptores opioides, receptores de potencial transitório e receptores glutamatérgicos (Tomaz-Morais et al., 2017; Carlini e Mendes, 2011).

2.2.1. Receptores opioides

Nas sinapses neuronais, os opioides podem atuar de forma inibitória ou excitatória por meio de junções pré-sinápticas ou pós-sinápticas (Dhaliwal e Gupta, 2023). O sistema opioide endógeno, intrinsecamente ligados à nocicepção e à dor, compreende os peptídeos β -endorfina, encefalinas, dinorfinas e três receptores acoplados à proteína G transmembrana 7, nomeadamente μ , δ e κ , compostos por subunidades α , β e γ . (Couto et al., 2023).

Os receptores opioides estão envolvidos na percepção sensorial, além de fornecer uma resposta a neurotransmissores, hormônios e medicamentos. Eles são encontrados principalmente nos neurônios sensoriais primários, mas estes receptores são amplamente inativos até que os neurônios recebam estímulos nocivos. Após a ligação do agonista, ocorre ativação do receptor, com inibição da

adenilil ciclase, levando à diminuição dos níveis de AMP cíclico, aumento da condutância do potássio, hiperpolarização dos neurônios e diminuição da condutância do cálcio, reduzindo, em última análise, a liberação do neurotransmissor. Os canais de potássio permanecem inalterados, resultando em hiperpolarização dos neurônios e bloqueio parcial da transmissão do estímulo da dor (Couto et al., 2023; Martins et al., 2012; Rachinger-Adam et al., 2011).

Os agonistas do receptor opioide são frequentemente usados para o tratamento da dor aguda moderada a grave. O efeito analgésico é mediado pela ativação dos sítios do receptor μ localizados no cérebro, tronco cerebral, medula espinhal e terminações nervosas periféricas, que estão associados à percepção da dor (Golan et al., 2014).

Dessa forma, os opioides exógenos podem induzir analgesia pela inibição da substância gelatinosa no corno dorsal da medula espinhal e nervos aferentes periféricos. A morfina, agonista natural dos receptores opioides de maior importância histórica, continua sendo amplamente usada em condições de dor intensa, no entanto, apesar do sistema opioide endógeno ser crucial para vários processos biológicos, o uso de opioides exógenos para alívio da dor é limitado por seus efeitos adversos, como sedação, depressão respiratória e constipação. (Shenoy e Lui, 2022; Sneddon, 2018).

2.2.2. Receptores de potencial transitório

Os receptores de potencial transitório (TRP) são canais iônicos para Na^+ e Ca^{2+} controlados por ligantes químicos vaniloides, como a capsaicina (o ingrediente pungente da pimenta-malagueta), calor acima de 42°C , e baixo pH extracelular ($\leq 5,9$) e fundamentam a detecção de estímulos mecânicos e químicos por meio da ativação do nociceptor (Marwaha, et al., 2016).

Os canais TRP controlam uma variedade de sensações térmicas, mudanças mecânicas e estímulos dolorosos. Existe uma variedade de canais TRP, incluindo TRPV1 (receptor de potencial transitório do tipo vaniloide) e TRPA1 (receptor de potencial transitório do tipo anquirina 1), que são expressos em nociceptores. Os canais TRP são um primeiro passo essencial para a percepção da dor, pois eles transduzem estímulos nocivos em correntes. Isso gera a sensação de dor ao

converter estímulos nocivos em sinais elétricos que são enviados ao sistema nervoso central (Sneddon, 2018).

Os canais iônicos TRPV sensíveis ao calor representam alvos para o desenvolvimento de novos fármacos destinados a interferir na sensação periférica de calor (Golan et al., 2014). O TRPV1 é expresso principalmente pelos neurônios do gânglio trigeminal (GT) e por neurônios de pequeno diâmetro dentro dos gânglios sensoriais, como o gânglio da raiz dorsal (Benítez-Angeles, et al., 2020).

Dentre uma série de agonistas endógenos, os produtos derivados de ácidos graxos poliinsaturados, como o ácido hidroxieicosapentaenóico, têm a capacidade de desencadear a mobilização de Ca^{2+} em um sistema de expressão heterólogo (células HEK) que expressa de forma estável os canais TRPV1 e TRPA1, assim como a hepxilina, um produto do ácido araquidônico (Benítez-Angeles, et al., 2020).

É importante mencionar que os canais TRPA1 também são proteínas sensíveis a estímulos nocivos que são co-expressas com TRPV1 em algumas subpopulações de neurônios sensoriais, daí a importância de avaliar os efeitos dos agonistas acima mencionados na atividade destes canais (Benítez-Angeles, et al., 2020).

2.2.3. Receptores glutamatérgicos

O glutamato é um modulador da dor no sistema nervoso central humano. No sistema nervoso periférico, atua como um algogênio, e modula as atividades dos nociceptores (Chung, 2020). Sugere-se que a maioria dos aferentes dos gânglios trigeminais (GT) são glutamatérgicos, pois aproximadamente 80% dos aferentes primários trigeminais expressam o transportador vesicular de glutamato (Chung, 2020).

Reconhecido como um importante neurotransmissor excitatório, o glutamato atua por meio de receptores ionotrópicos, N-metil-D-aspartato (NMDA), receptores de ácido 2-amino-3-(3-hidroxi-5-metil-isoxazol-4-il) propanoico (AMPA), receptores de cainato e receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs) (Chung, 2020).

Os receptores ionotrópicos de glutamato medeiam as respostas sinápticas excitatórias rápidas e consistem em canais seletivos de cátions constituídos de

múltiplas subunidades que, com a sua ativação, possibilitam o fluxo de íons Na⁺, K⁺ e, em alguns casos, Ca²⁺ pelas membranas plasmáticas (Hanada, 2020).

Os receptores AMPA estão localizados em todo o SNC, particularmente no hipocampo e córtex cerebral (Golan et al., 2014). A ativação do receptor AMPA pela ligação do glutamato resulta principalmente no influxo de Na⁺ e efluxo de K⁺, nenhum outro ligante endógeno foi descoberto até o momento. Eles são predominantemente expressos na membrana neuronal pós-sináptica e desempenham um papel na neurotransmissão excitatória rápida na rede cerebral. (Hanada, 2020).

Os receptores de cainato são expressos em todo o SNC, particularmente em hipocampo e cerebelo. Foram identificadas cinco subunidades do receptor de cainato. À semelhança dos receptores AMPA, os receptores de cainato possibilitam o influxo de Na⁺ e o efluxo de K⁺ por meio de canais e apresentam cinética rápida de ativação e desativação (Golan et al., 2014).

Os receptores NMDA são expressos principalmente em hipocampo, córtex cerebral e medula espinal e consistem em complexos transmembrana oligoméricos compostos de múltiplas subunidades (Golan et al., 2014). Sua ativação, que exige a ligação simultânea de glutamato e glicina, abre um canal que possibilita o efluxo de K⁺ e influxo de Na⁺ e Ca²⁺. Os receptores NMDA diferem dos outros receptores ionotrópicos de glutamato, pois exigem múltiplas ligações para a ativação do canal, e sua regulação depende de uma atividade pré-sináptica mais intensa que a necessária para abrir os receptores AMPA ou cainato (Hanada, 2020).

Os receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs) são receptores acoplados à proteína G que foram categorizados em três grupos com base em suas vias de transdução de sinal e perfis farmacológicos. Os receptores do grupo I provocam excitação neuronal por meio da ativação da fosfolipase C e da liberação de Ca²⁺, ou por ativação da adenilciclase e produção de AMPc. Os receptores dos grupos II e III inibem a adenilciclase e diminuem a produção de AMPc. Consecutivamente, essas vias de segundos mensageiros regulam os fluxos iônicos de outros canais (Crupi et al., 2019).

Como todos esses receptores são expressos nos terminais periféricos de aferentes cutâneos de pequeno diâmetro, o glutamato exógeno ou endógeno pode evocar ou modular a nocicepção por meio desses receptores (Chung, 2020). Há evidências acumuladas de que a transmissão glutamatérgica contribui para o

desenvolvimento e/ou a manutenção da hiperalgesia. Os receptores NMDA aumentam a transmissão sináptica entre fibras aferentes nociceptivas e neurônios do corno dorsal da medula espinal. Os antagonistas experimentais dos receptores NMDA podem impedir e reverter a sensibilização central nesses pacientes (Golan et al., 2014).

2.3. Dor orofacial

A dor orofacial é comumente referida como uma condição mórbida da cavidade oral ou face. Pode estar associada, no entanto, a dor de cabeça e pescoço, cefaleia primária, cervicalgia ou distúrbios reumáticos (como fibromialgia e artrite reumatoide) (Limeira, et al., 2022). A dor de origem dentária é frequentemente relatada e está associada a alta prevalência de cárie dentária, que está ligada à doenças pulpares inflamatórias e ao impacto negativo na qualidade de vida (Labanca et al. 2023). No Brasil, a prevalência de dor dentária entre escolares brasileiros de 8 a 10 anos é cerca de 51,5% (Santos, et al., 2019).

No entanto, condições crônicas de dor orofacial primária não odontogênica, como distúrbios temporomandibulares, dor miofascial e artralgia, neuralgia trigeminal e síndrome de ardência bucal, também são condições comumente encontradas na clínica e evidências apoiam etiologia e fisiopatologia complexas e multifatoriais. Diante disto, as descobertas científicas ainda precisam se traduzir em melhores cuidados com o manejo da dor (Sadighparvar, et al., 2023).

2.3.1. Terapias atuais no tratamento da dor orofacial

As terapias farmacológicas atuais para tratamento da dor orofacial incluem o uso de analgésicos e corticosteroides para condições agudas, e anti-inflamatórios não esteroidais (AINES), anestésicos locais e relaxantes musculares para condições agudas e crônicas (Tomaz-Morais et al., 2017).

Esse tratamento multifarmacológico é empregado por que não existe um medicamento ideal para tratar a dor no complexo orofacial, visto que, embora os medicamentos disponíveis sejam eficazes, necessitam de acompanhamento profissional, pois causam efeitos adversos relevantes, como tolerância e

dependência, principalmente quando se trata de opioides. Somado a isso, outras condições indesejáveis como disfunção renal, hipertensão, hemorragias, úlceras gástricas, hiperglicemia e imunossupressão também podem estar presentes (Limeira et al., 2023; Haggman-Henrikson et al., 2017).

Ademais, de acordo com o Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos, mais de 70.000 pessoas morreram por overdose de drogas em 2017, das quais 47.000 foram devido ao uso de opioides (Limeira et al., 2022).

Nesse cenário, o uso de outros agentes com atividade analgésica na dor orofacial ganha importância, sobretudo com a perspectiva de substituição ou diminuição do uso e/ou dose dos fármacos atualmente comercializados (Tomaz-Morais et al., 2017).

2.4. Derivados tiofênicos

Os compostos heterocíclicos têm historicamente desempenhado um papel importante na busca por produtos bioativos. Observa-se que mais de 75% dos fármacos em uso clínico têm pelo menos um anel heterocíclico em sua estrutura química (Sharma et al., 2020). O tiofeno e seus derivados substituídos, todos compostos heterocíclicos, têm sido foco de interesse por quase duas décadas (Cruz et al., 2021).

Os derivados de tiofeno fornecem intermediários úteis em várias áreas da ciência e da indústria, com uma ampla gama de aplicações e propriedades terapêuticas (Lahsasni et al., 2018). Quanto às suas aplicações biológicas e farmacológicas, os derivados do tiofeno possuem propriedades notáveis como agentes antipsicóticos, ansiolíticos, antifúngicos, antimicrobianos, antioxidantes, anticancerígenos e anti-inflamatórios. Tinoridina, ácido tiaprofênico, Tenidap e Zileuton são os exemplos mais conhecidos de fármacos disponíveis comercialmente com propriedades anti-inflamatórias que contêm um anel tiofênico (Cruz et al., 2021).

Os AINEs foram desenvolvidos com o objetivo de inibir a atividade da COX, enzimas que medeiam diretamente a produção de prostaglandinas, mas o grau de inibição de cada isoforma, ou seja, COX-1 ou COX-2, pode variar e determina perfis de efeitos colaterais (Prozzi et al., 2018). Muitos derivados tiofênicos já foram

descritos como potenciais inibidores dessas importantes enzimas (Cruz et al., 2021).

Nesse contexto, uma revisão de uma série de estudos realizada por Cruz et al., 2021, demonstra a importância dos compostos à base de tiofeno como estruturas privilegiadas no design de fármacos e na descoberta de novos agentes anti-inflamatórios, apresentando atividade anti-inflamatória superior aos AINEs de referência, demonstrada em ensaios *in vitro*, *in silico* e *in vivo*.

2.5. Docking Molecular

Desde sua primeira aparição em meados da década de 1970, o docking provou ser uma ferramenta importante para ajudar a entender como os compostos químicos interagem com seus alvos moleculares e para a descoberta e desenvolvimento de medicamentos como identificação e otimização de acertos, identificação de alvos a posteriori (triagem reversa), design de ligantes multialvo e reposicionamento (Pinzi e Rastelli, 2019).

O docking também tem sido usado recentemente para uma variedade de outros propósitos na descoberta de medicamentos. Em particular, o docking reverso, que permite prever os alvos biológicos de uma molécula de interesse, e representa uma abordagem valiosa para a criação de perfis computacionais de alvos (Torres et al., 2019).

As principais limitações que caracterizam o docking incluem uma amostragem restrita de conformações de ligantes e receptores na predição de pose e o uso de funções de pontuação aproximadas, que muitas vezes fornecem resultados que não se correlacionam com as afinidades de ligação experimentais. No entanto, a aplicação do docking no design de fármacos é limitada a alvos biológicos para os quais as estruturas cristalinas são conhecidas (Yuriev e Ramsland, 2013).

Várias abordagens e algoritmos de docking estão disponíveis para permitir a triagem reversa de um ligante em direção a uma biblioteca de estruturas de proteínas e para avaliar sua afinidade de ligação. Quanto mais negativo for o valor de energia obtido da análise dessas interações alvo-ligante, mais afinidade a interação possui (Pinzi e Rastelli, 2019).

Além disso, bibliotecas personalizadas de alvos também podem ser construídas manualmente em bancos de dados disponíveis publicamente de estruturas cristalinas, como o Protein Data Bank (PDB). Em particular, os bancos de dados PDB representa um reservatório bem conhecido de informações desenvolvidas para ajudar a facilitar a biologia computacional, molecular e estrutural (Pinzi e Rastelli, 2019).

As técnicas computacionais aplicadas ao desenvolvimento e descoberta de novos fármacos permitem o direcionamento dos estudos, otimizando tempo, trabalho e custos operacionais. Atualmente, tornou-se uma das etapas iniciais para o direcionamento dos ensaios pré-clínicos, inclusive, direcionando na compreensão de diversos mecanismos moleculares ou fenômenos biológicos. Logo, o docking molecular é uma abordagem que permite entender o processamento do acoplamento e interações de moléculas a uma proteína em nível atômico. Os cálculos gerados permitem prever a pose, orientações e afinidade do ligante aos sítios ativos do alvo (SILVA, 2023).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Analisar o efeito antinociceptivo orofacial de um derivado 2-aminotiofênico sobre o modelo experimental de nocicepção em camundongos e elucidar o seu possível alvo de ação por meio de abordagem *in silico*.

3.2 Objetivos específicos

- a) Investigar a ação antinociceptiva do derivado 2-aminotiofênico 7CN03 diante da interação com receptores opioides.
- b) Investigar a ação antinociceptiva do derivado 2-aminotiofênico 7CN03 diante da interação com receptor NMDA de glutamato.
- c) Investigar a ação antinociceptiva do derivado 2-aminotiofênico 7CN03 diante da interação com receptor de potencial transitório vaniloide 1.
- d) Predizer o potencial farmacológico em alvos relacionados a atividade antinociceptiva através de metodologias *in silico* de modelagem molecular;
- e) Sugerir um possível mecanismo de ação para os efeitos do derivado 2-aminotiofênico 7CN03.

4. ARTIGO 1

O manuscrito a seguir foi submetido para publicação no periódico “Brazilian Oral Research” e encontra-se em análise.

EFEITO ANTINOCICEPTIVO OROFACIAL DE UM NOVO DERIVADO 2-AMINO-TIOFENO E SEUS POSSÍVEIS ALVOS DE AÇÃO

RESUMO

A dor na região orofacial compromete a qualidade de vida, e as terapias atuais, limitadas em eficácia e com efeitos adversos, impulsionam a busca por novos tratamentos. Os derivados tiofênicos possuem propriedades terapêuticas notáveis, entre elas antinociceptiva e anti-inflamatória, e estudos recentes mostram atividade superior a medicamentos comerciais, destacando sua importância na concepção de novos agentes. Este estudo investigou o efeito antinociceptivo do derivado tiofênico 2-[(4-dietilamino-benzilideno)-amino]-5,6,7,8-tetra-hidro-4H-ciclohepta[b]tiofeno-3-carbonitrila (7CN03) e seus possíveis mecanismos ação. Em testes *in vivo* com camundongos machos (n = 6 por grupo), a nocicepção foi induzida por formalina, capsaicina e glutamato, uma hora após o tratamento, e a fricção facial serviu como parâmetro para medir o comportamento nociceptivo. O 7CN03, em diferentes doses (1 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,01 mg/kg), apresentou ação significativa na fase neurogênica no teste de formalina, reduzindo o comportamento nociceptivo em até 56%. Na fase inflamatória, a dose de 1 mg/kg promoveu efeito antinociceptivo, com redução do comportamento nociceptivo em 32% ($p < 0,05$). No teste com glutamato, o 7CN03 bloqueou a nocicepção em até 90% ($p < 0,001$), e no teste com capsaicina, reduziu o comportamento nociceptivo em até 74%. Estudos de docking molecular indicaram predição de maior afinidade do 7CN03 com os receptores μ -opioide (-97,00 Kcal/mol), TRPV1 (-87,79 Kcal/mol) e NMDA (-104,86 Kcal/mol) quando comparado com os ligantes cocrystalizados. Os achados sugerem que o derivado tiofênico avaliado apresenta efeito antinociceptivo orofacial, com predição mecanismo de ação por envolvimento de receptores opióides, de potencial transitório vanilóide e glutamatérgico.

Palavras-chave: Dor facial. Analgésicos. Tratamento da dor. Derivado tiofênico. Modelos animais.

1. INTRODUÇÃO

A dor orofacial é comumente citada como uma comorbidade da cavidade oral ou face e se caracteriza pela presença da dor nos tecidos moles e/ou mineralizados (Matsuka, 2022). Sua etiologia pode ser de origem odontogênica ou não odontogênica, esta última de difícil diagnóstico, acometendo músculos, articulações e nervos, bem como pode estar associada a cefaleia, cervicalgia e doenças reumáticas, como fibromialgia e artrite reumatoide (Matsuka, 2022; Shaefer et al., 2018). Diante dessa complexidade, a dor orofacial é considerada um dos problemas mais graves de saúde em todo o mundo, e muitos pacientes não conseguem encontrar métodos eficazes de tratamento (Joury et al., 2018).

A prevalência de dor na região orofacial é de 30,2% em países em desenvolvimento, parcela importante da população que pode ter a qualidade de vida impactada diante das repercussões biológicas desse problema, pois está associado a limitação funcional e desconforto psicológico (Ananthan e Benoliel, 2020).

Distintivamente do sistema espinhal, a condução de impulsos nociceptivos através dos nervos trigêmeos é realizada por órgãos não localizados em outras partes do corpo e representa um nível particular da região facial (Beirith et al., 2002). A singularidade do sistema trigeminal é a integração das entradas nociceptivas em mais de um nível, ou seja, no tronco cerebral, no subnúcleo caudal e nos outros componentes do complexo nuclear trigeminal, que também processam as propriedades do toque epicrítico e da propriocepção da face (Hargreaves, 2011).

As terapias atuais para o tratamento da dor orofacial incluem o uso de analgésicos ou anti-inflamatórios, sejam eles não-esteroidais ou esteroidais. Entretanto, não existe um medicamento ideal para tratar o complexo orofacial, uma vez que os medicamentos atualmente empregados têm o seu uso limitado ou interrompido em consequência de efeitos adversos como distúrbios gastrointestinais, hepáticos e renais ou reações de hipersensibilidade (Bindu et al., 2020). Quando se considera os opióides em particular, a tolerância e dependência farmacológica, responsáveis por altas taxas de morbidade e mortalidade em países desenvolvidos, tornando-se evidente a necessidade de doses menores ou mesmo

substituição dessa classe de medicamentos por outros agentes (Upp e Waljee, 2020).

Os Anti-inflamatórios não esteroides (AINES) comerciais, a exemplo da tinoridina e ácido tiaprofênico (usado especialmente para o tratamento da dor artrítica), contêm um anel tiofênico (Cruz et al., 2020). Estudos recentes mostram a importância deste anel, onde o mesmo serve como base para o desenvolvimento de drogas e na descoberta de novos agentes anti-inflamatórios. A grande maioria de seus derivados planejados e sintetizados apresentam atividade anti-inflamatória superior aos AINEs de referência, conforme demonstrado em ensaios *in vitro*, *in silico* e *in vivo* (Cruz et al., 2021; Cruz et al., 2020; Mota et al., 2018).

Nesse contexto, o derivado tiofênico 2-[(4-dietilamino-benzilideno)-amino]-5,6,7,8-tetra-hidro-4H-ciclohepta[b]tiofeno-3-carbonitrila (7CN03) se destaca como um agente promissor para o tratamento da dor orofacial, visto que nossos estudos anteriores demonstraram atividade analgésica no sistema espinhal. Em dados ainda não publicados, descobrimos que o 7CN03 apresentou efeito antinociceptivo em doses de 1 mg/kg, 0,1 mg/kg e 0,01 mg/kg (v.o.). Esses achados sustentam a hipótese de que esse composto apresenta efeito antinociceptivo que envolve o sistema trigeminal.

O objetivo deste estudo foi investigar o efeito antinociceptivo orofacial do derivado 2-amino-tiofênico 7CN03 em camundongos usando modelos animais de nocicepção que envolvem receptores opióides, de potencial transitório (TRP) e glutamatérgicos, além de elucidar os possíveis alvos de ação da substância através de avaliação de ancoragem molecular.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Testes *in vivo*

2.1.1. Local de pesquisa, aspectos éticos e animais

Neste estudo experimental, não clínico, controlado e triplo-cego, foram usados camundongos albinos *swiss* adultos saudáveis (*Mus musculus*) pesando 30 a 40 g. Os camundongos foram mantidos em condições de temperatura controlada

($21 \pm 2^\circ\text{C}$) e um ciclo claro/escuro de 12 horas com comida e água *Ad libitum*. Todos os animais foram obtidos da Unidade de Produção Animal do Instituto de Pesquisa em Medicamentos e Fármacos (IPFarm) da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Estado da Paraíba, Brasil.

O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal da Paraíba (Protocolo n.º 7123201123/2023). Um número reduzido de animais foi considerado para os experimentos, bem como medidas de controle de sofrimento ou estresse em todas as fases da experimentação foram adotadas de acordo com as diretrizes éticas para pesquisa com animais.

A definição do tamanho amostral ocorreu em função de critérios estatísticos, considerando os seguintes parâmetros: teste T, com dois lados (lateralidade), tamanho (magnitude) do efeito igual a 2.444, nível de significância de 5% ($\alpha=5\%$) e poder de 90%, usando o Programa GPower, versão 3.1. Esses parâmetros indicaram a necessidade de utilização de 5 animais por grupo experimental, com adição de 20% de possível perda, portanto foram requeridos 6 animais por grupo.

2.2.2 Substâncias e Reagentes

7CN03, quimicamente 2-[(4-dietilamino-benzilideno)-amino]-5,6,7,8-tetra-hidro-4H-ciclohepta[b]tiofeno-3-carbonitrila (Figura 1), foi resintetizado em duas etapas reacionais, conforme descrito anteriormente em Rodrigues et al. (2015) e teve seus dados espectrais comparados com os dados publicados em da Cruz (2011). O composto foi sintetizado no Laboratório de Síntese e Vetorização Molecular (LSMV) da Universidade Estadual da Paraíba, Brasil.

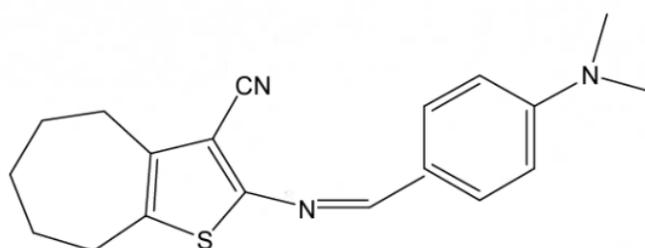


Figura 1. 2-[(4-dietilamino-benzilideno)-amino]-5,6,7,8-tetra-hidro-4H-ciclohepta[b]tiofeno-3-carbonitrila (7CN03) (da Cruz, 2011).

Também foram usados os compostos: cloridrato de morfina (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA), glutamato (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA), capsaicina (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA), formaldeído (Vetec®, Rio de Janeiro, RJ, Brasi), dizocilpina (MK-801) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA) e Tween-80 (Vetec®, Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

2.2.3 Delineamento da pesquisa e protocolos experimentais para indução de nocicepção orofacial

Três modelos foram conduzidos para a avaliação da atividade antinociceptiva orofacial do 7CN03: a) nocicepção induzida por formalina, b) nocicepção induzida por glutamato e c) nocicepção induzida por capsaicina. Os experimentos referentes a cada modelo ocorrem em três grupos independentes, onde cada grupo constituiu-se em 30 animais divididos em cinco subgrupos de camundongos igualmente distribuídos.

Os animais foram pré-tratados com morfina a 20 mg/kg (v.o) ou MK-801 (Teste de indução de nocicepção pelo glutamato) a 15 µg/kg (i.p), 7CN03 a 1 mg/kg (v.o), 7CN03 a 0,1 mg/kg (v.o), 7CN03 a 0,01 mg/kg (v.o), e solução salina (cloreto de sódio a 0,9%) (v.o) em 20 µL de solução, uma hora antes da indução de nocicepção orofacial. As dosagens do teste de 7CN03 foram determinadas com base nos efeitos do mesmo no sistema espinal.

O gerenciamento dos dados e métodos de cegamento foram realizados com objetivo de reduzir possíveis vieses no método de coleta e análise dos dados. O sequenciamento de testes se deu de forma randomizada, com alocação aleatória dos animais. A preparação, o desempenho e a análise comportamental foram triplo-cegos de acordo com protocolo realizado por Tomaz-Morais et al. (2017).

2.2.3.1 Modelos de nocicepção orofacial induzida por formalina, capsaicina e glutamato

Em razão da especificidade da inervação sensitiva da face, que é realizada pelo nervo trigêmeo, cujas fibras carregam estímulos sensoriais de toque, pressão,

temperatura e dor, a injeção perinasal das substâncias indutoras de nocicepção é bem indicada nesses modelos.

2.2.3.1.1 Nocicepção orofacial induzida por formalina

Conforme protocolo descrito por Quintans-Júnior et al. (2010), uma hora, após o tratamento com o composto teste 7CN03 por via oral, 20 µL de uma solução de formalina a 2,5% (formaldeído em água destilada) foi administrada por via subcutânea na porção lateral do lábio superior (região paranasal) dos camundongos utilizando uma agulha de calibre 27. O comportamento nociceptivo foi observado durante 40 minutos, correspondente a primeira fase - neurogênica (0-5 min) e a segunda fase - inflamatória (15-40 min). A atividade nociceptiva foi determinada a partir do registro do tempo de fricção (em segundos) da área injetada com a pata ipsilateral dianteira ou traseira.

2.2.3.1.2 Nocicepção orofacial induzida por glutamato

O modelo de nocicepção induzida por glutamato foi realizado conforme descrito por Beirith et al. (2002). Neste, 20 µL de uma solução de 15 µg de glutamato foram administrados por via subcutânea na porção lateral do lábio superior direito dos camundongos com uma agulha de calibre 27 uma hora após o tratamento com 7CN03 (v.o.). Em seguida, os animais foram observados durante 15 minutos após a aplicação do glutamato. Assim como se deu no teste anterior, a atividade nociceptiva foi determinada a partir do registro do tempo de fricção (em segundos) da área injetada com a pata ipsilateral dianteira ou traseira.

2.2.3.1.3 Nocicepção orofacial induzida por capsaicina

O modelo de indução de nocicepção por capsaicina seguiu o protocolo relatado por Pelissier et al. (2002) e adaptado por Quintans-Júnior et al. (2010). Os testes se deram a partir da administração de 20 µL de uma solução de 2,5 µg de capsaicina no lábio superior direito de camundongos uma hora após o tratamento com 7CN03 (v.o), seguida da observação do comportamento nociceptivo (fricção da área injetada com a pata ipsilateral dianteira ou traseira) por 20 minutos.

2.3 Análise estatística

Após a realização de teste de normalidade e comprovação de amostragem paramétrica, os resultados obtidos foram analisados por meio de ANOVA seguido do teste post-hoc de Tukey usando o software Graph Pad Prism, versão 5.0. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão (DP). Foi considerado nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

2.4 Teste *in silico*

2.4.1 Docking molecular

O composto 7CN03, em sua forma pró-fármaco, foi modelado usando o software MarvinSketch v.23.14 e otimizado usando o método MMFF semi-empírico do Spartan v.14 (Chemaxon, 2023; Wavefunction, 2014). As estruturas cristalográficas de seis alvos envolvidos na fisiopatologia da dor foram selecionadas do Protein Data Bank (PDB) (Tabela 1). Como comparativo, foram selecionados agonistas (receptores opioides) ou antagonistas (TRPV1, TRPA1 e NMDAR) de cada um dos alvos.

Tabela 1. Alvos e ligantes usados no docking molecular.

| Alvo | PDB (ID) | Resolução | Ligantes |
|----------------------------|----------|-----------|-------------|
| Receptor μ -opioide | 8EF6 [3] | 3,20 Å | Morfina |
| Receptor δ -opioide | 6PT3 [4] | 3,10 Å | DPI-287 |
| Receptor κ -opioide | 6B73 [5] | 3,30 Å | MP1104 |
| TRPV1 | 5IS0 [6] | 3,43 Å | Capsazepina |
| TRPA1 | 7JUP [7] | 3,05 Å | AM-0902 |
| Receptor NMDA | 7EOQ [8] | 3,50 Å | Escetamina |

O software Molegro Virtual Docker v.2013.6.0.1 foi utilizado para realizar o docking molecular (CLC Bio Company, 2013). Todas as moléculas de água e os cofatores foram excluídos e antes do docking molecular, a etapa de redocking foi

realizada, a fim de avaliar a precisão e confiabilidade dos resultados a partir do *Root-Mean-Square Deviation* (RMSD). O RMSD é uma etapa necessária para verificar se o algoritmo foi capaz de produzir a pose correta e valores $\leq 2 \text{ \AA}$ são considerados satisfatórios. Os valores de RMSD não foram considerados para o receptor NMDA (PDB: 7EOQ) por não possuir ligante cocrystalizado disponível e a escetamina foi utilizada como controle positivo.

A simulação foi conduzida usando as configurações padrão. A função MolDock Score foi utilizada para avaliar as poses do ligante, considerando energia interna, ligações de hidrogênio e contribuições de energia torcional. Vinte *runs* foram realizadas usando o algoritmo MolDock SE, e as 5 principais poses foram mantidas. Uma grade com raio de 15 Å e resolução de 0,30 Å foi gerada centrada nas posições dos ligantes cristalográficos nas proteínas selecionadas. As poses encaixadas foram posteriormente analisadas usando o Discovery Studio Visualizer v21.1.0.20298 (Dassault Systèmes, 2019).

3 RESULTADOS

3.1 Testes *in vivo*

O teste da formalina é amplamente utilizado como modelo experimental para avaliar mecanismos de dor e a eficácia de agentes antinociceptivos, devido à sua capacidade de reproduzir uma resposta bifásica que reflete diferentes processos nociceptivos. Trata-se de um teste inespecífico, relacionado com a modulação da resposta em receptores como TRPV1, NMDA e receptores opioides (Hunskar e Kjell, 1987).

No modelo de nocicepção induzida por formalina, na fase neurogênica, a exposição aguda ao 7CN03 nas doses de 1 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,01 mg/kg, reduziram significativamente o comportamento de fricção da face, respectivamente em: 52% ($39,83 \pm 9,083$), 55% ($36,67 \pm 3,870$) e 56% ($36,00 \pm 5,027$) em relação ao grupo veículo. Também foi observada redução significativa do movimento de fricção da face em 77% ($18,8 \pm 5,2 \text{ s}$) para o grupo de camundongos tratados com a morfina (20 mg kg^{-1}). Esses achados estão descritos na figura 2.

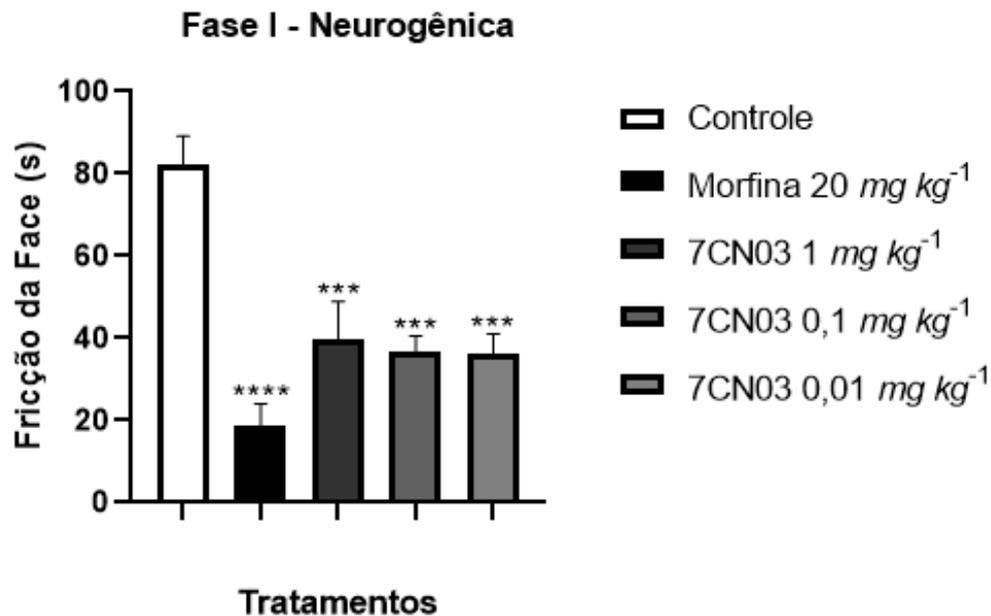


Figura 2. Efeito do 7CN03 na nocicepção orofacial induzida pela formalina (Fase neurogênica). Veículo (Tween 80 5% + Salina, v.o), 7CN03 (1, 0,1 e 0,01 mg/kg, v.o) e morfina (20 mg/kg, v.o). Valores foram expressos em média e DP (n= 6, por grupo). Análise estatística: ANOVA unidirecional seguida do teste de Tukey, *p<0,05, **p<0,01, ****p<0,001: (7CN) = vs. veículo e (Morfina) = vs. veículo.

Na segunda fase do teste da formalina (inflamatória), apenas a dose de 1 mg/kg do 7CN03 reduziu significativamente o comportamento nociceptivo ($37,50 \pm 12,0$ s) em relação ao grupo veículo, o equivalente a 62% menos tempo de fricção da face. Morfina ($20\ mg\ kg^{-1}$) também promoveu redução significativa da nocicepção orofacial em 67% ($32,3 \pm 12,4$ s), em relação ao grupo veículo ($99,6 \pm 5,6$ s). Esses resultados são visualizados na figura 3.

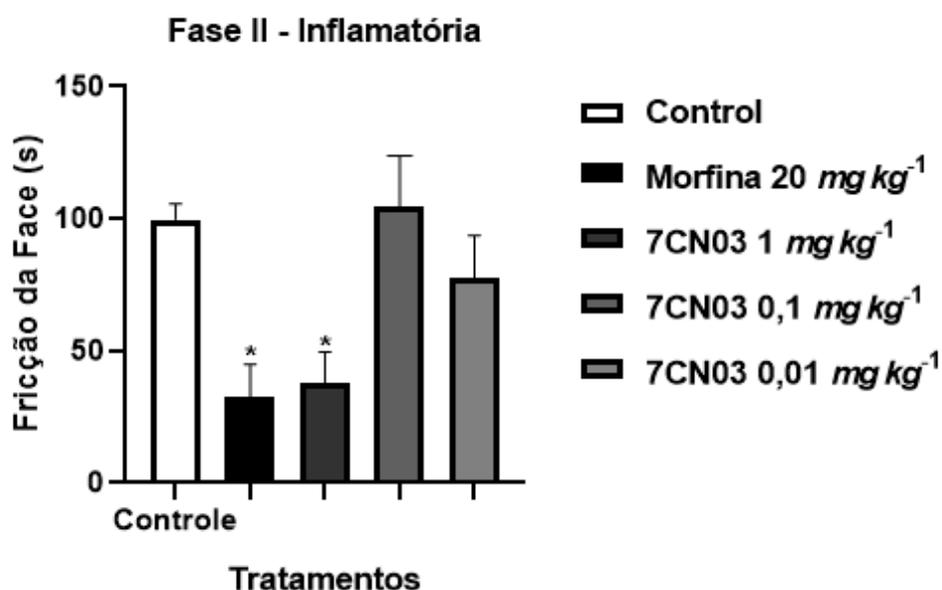


Figura 3. Efeito do 7CN03 na nocicepção orofacial induzida pela formalina (Fase inflamatória). Veículo (Tween 80 5% + Salina, v.o), 7CN03 (1, 0,1 e 0,01 mg/kg, v.o) e morfina (20 mg/kg, v.o). Valores foram expressos em média e DP (n= 6, por grupo). Análise estatística: ANOVA unidirecional seguida do teste de Tukey, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,001$: (7CN) = vs. veículo e (Morfina) = vs. veículo.

A indução de nocicepção experimental por glutamato permite avaliar o impacto de novos agentes no bloqueio dessa via excitatória e na modulação de receptores associados, especialmente NMDA, frequentemente implicados na plasticidade sináptica e na cronificação da dor (Petrenko et al., 2003).

Nesse teste, quando comparado ao grupo veículo, o 7CN03 causou uma redução significativa no comportamento nociceptivo orofacial ($p < 0,05$) nas três doses testadas.

Como indicado na figura 4, o grupo de camundongos tratados com 7CN03 nas doses de 1 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,01 mg/kg, reduziram significativamente o comportamento de fricção da face, respectivamente, em: 81% ($10,17 \pm 1,62$), 90% ($5,0 \pm 1,50$) e 85% ($8,16 \pm 2,57$) em relação ao grupo veículo ($54,5 \pm 7,0$ s). O antagonista de receptor NMDA de glutamato MK-801 ($15\ \mu g\ kg^{-1}$) reduziu significativamente o movimento de fricção da face em 95% ($2,3 \pm 0,5$ s).

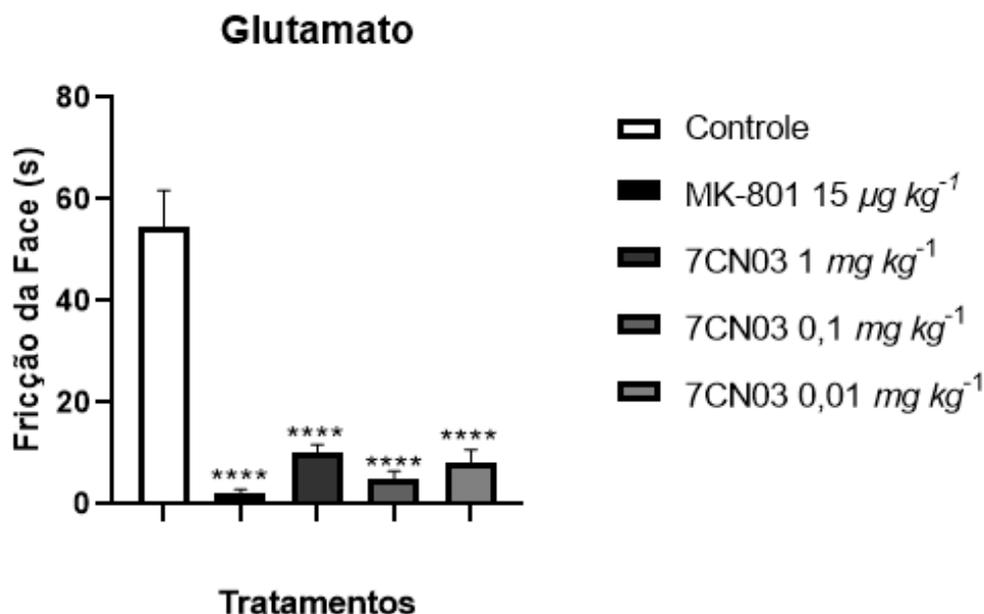


Figura 4. Efeito do 7CN03 na nocicepção orofacial induzida pelo glutamato. Veículo (Tween 80 5% + Salina, v.o), 7CN03 (1, 0,1 e 0,01 mg/kg, v.o) e MK-801 (15 $\mu\text{g/kg}$, i.p). Valores foram expressos em média e DP (n= 6, por grupo). Análise estatística: ANOVA unidirecional seguida do teste de Tukey, *p<0,05, **p<0,01, ****p<0,001: (7CN) = vs. veículo e (MK-801) = vs. veículo.

O modelo de nocicepção induzida por capsaicina é particularmente relevante para avaliar compostos que modulam o receptor de potencial transitório vanilóide 1 (TRPV1), canal iônico altamente sensível ao calor, prótons e compostos químicos como a capsaicina, contribuindo para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para condições dolorosas agudas e crônicas associadas à hiperatividade deste (Caterina et al., 1997).

Nos testes de indução de nocicepção com capsaicina, a exposição aguda ao 7CN03 nas doses de 0,1 mg/kg, 0,01 mg/kg, reduziram significativamente o comportamento de fricção da face, respectivamente em: 71% ($23,40 \pm 3,25$) e 74% ($20,80 \pm 1,98$) em relação ao grupo controle ($81,6 \pm 22$ s). Nesse teste, apesar de reduzir o comportamento nociceptivo em 58% ($34,20 \pm 8,47$), a dose de 1 mg/kg não apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparada as outras doses. O grupo de camundongos tratados com a morfina (20 mg kg^{-1})

reduziu significativamente o movimento de fricção da face em 84% ($12,6 \pm 4,8$ s). Esses resultados são apresentados na figura 5.

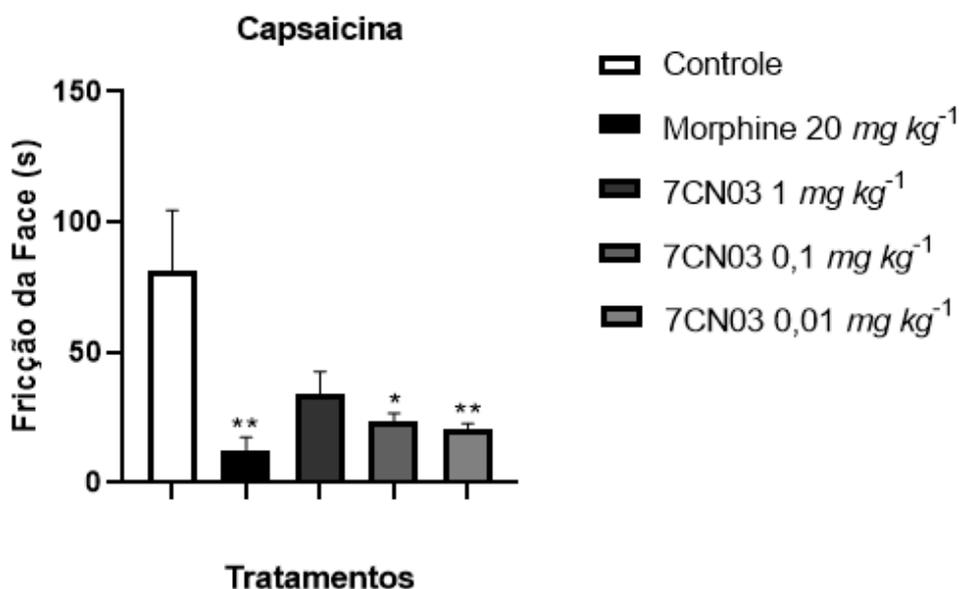


Figura 5. Efeito do 7CN03 na nocicepção orofacial induzida pela capsaicina. Controle (Tween 80 5% + Salina, v.o), 7CN03 (1, 0,1 e 0,01 mg/kg, v.o) e morfina (20 mg/kg, v.o). Valores foram expressos em média e DP (n= 6, por grupo). Análise estatística: ANOVA unidirecional seguida do teste de Tukey, *p<0,05, **p<0,01, ****p<0,001: (7CN) = vs. controle e (Morfina) = vs. controle.

3.2 Docking molecular

O complexo formado por 7CN03 e os receptores μ -opioide, TRPV1 e NMDA indicaram escores mais negativos quando comparado àquele formado com os controles. Esses achados estão expressos na Tabela 2.

Tabela 2. Escores de MolDock (em Kcal/mol) e RMSD dos complexos analisados.

| Alvos | Ligantes | Escore MolDock | RMSD |
|----------------------------|----------|----------------|------|
| Receptor μ -opioide | 7CN03 | -97,00 | 0,14 |
| | Morfina | -71,43 | |
| Receptor δ -opioide | 7CN03 | -112,31 | 0,28 |
| | DPI-287 | -141,16 | |
| Receptor κ -opioide | 7CN03 | -107,28 | 0,15 |
| | MP1104 | -138,26 | |
| TRPA1 | 7CN03 | -134,28 | 0,35 |
| | AM-0902 | -195,21 | |
| TRPV1 | 7CN03 | -87,79 | 0,66 |

| | | | |
|---------------|-------------|----------------|---|
| | Capsazepina | -85,05 | |
| Receptor NMDA | 7CN03 | -104,86 | - |
| | Escetamina | -80,87 | |

As figuras 6, 7 e 8 apresentam os principais tipos de interações entre o composto testado e aminoácidos dos receptores avaliados.

O complexo formado por 7CN03 e o receptor μ -opioide mostrou um escore mais negativo (-97,00) quando comparado àquele formado com a morfina (-71,43) (Tabela 2). A análise das interações envolvidas mostra aminoácidos comuns aos dois complexos: Met153, Ile298, Val302 e Tyr150 (Quadro 1, Figura 6 a,b).

Quadro 1. Tipos de interações formadas entre ligantes e resíduos dos alvos analisados, destacando os resíduos comuns aos dois ligantes (negrito).

| Ligante | Pi-alquila | Empilhamento pi-pi | Ligação de hidrogênio | Ligação carbono-hidrogênio |
|----------------------------|--|--------------------|-----------------------|----------------------------|
| Receptor μ -opioide | | | | |
| 7CN03 | Met153, Ile298, His299, Val302, Ile324, Tyr328. | - | - | Tyr150, Lys235 |
| Morfina | Met153, Tyr150, Val238, Ile298, Val302, Trp320. | His299 | Tyr150 | Asp149, Tyr150 |
| Receptor δ -opioide | | | | |
| 7CN03 | Ala98, Met132, Ile136, Trp274, Ile277, His278, Val281. | Tyr308 | | Gly307, Ser131 |
| DPI-287 | Ala98, Tyr129, Met132, Phe280, Val281, Trp284, Leu300, Ile304. | Tyr308 | | |

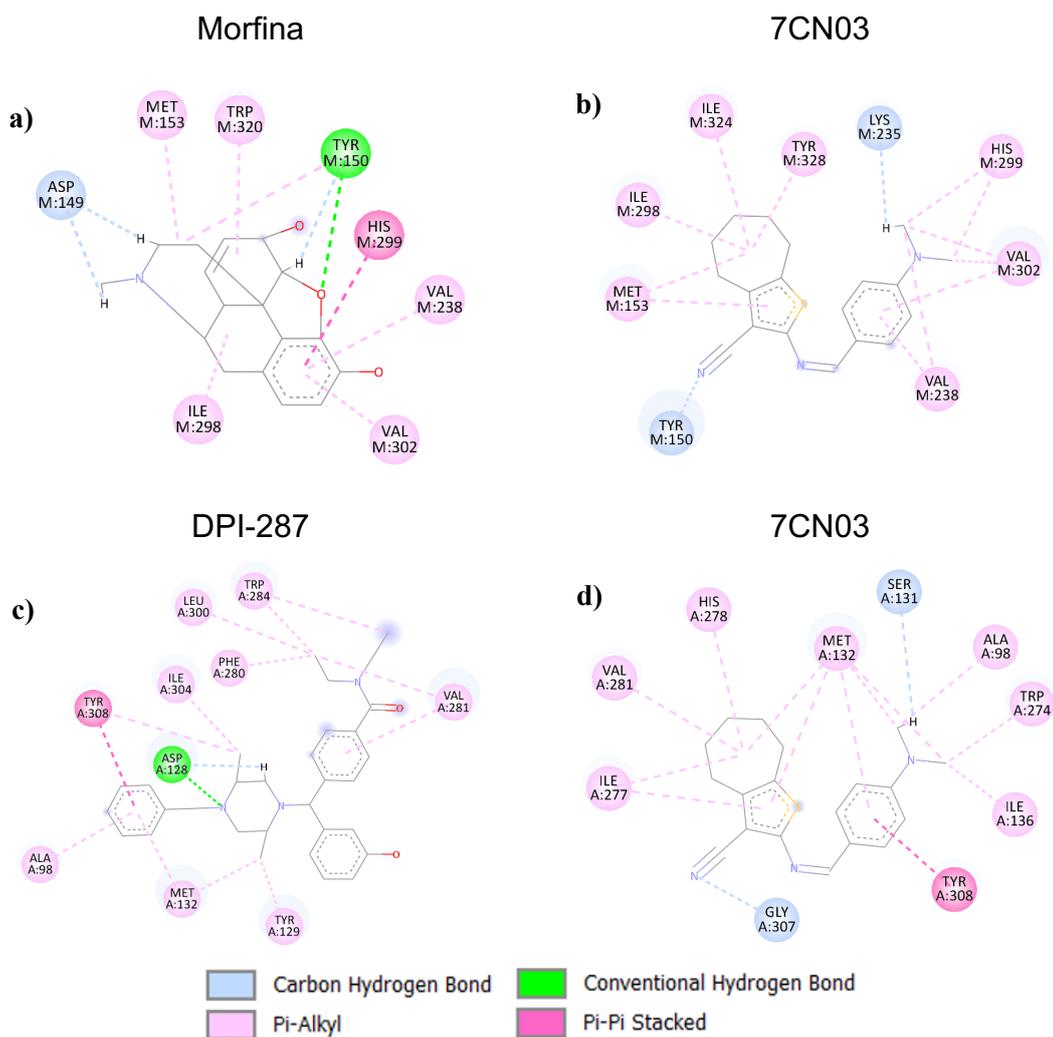


Figura 6. Interações formadas entre 7CN03 e controles positivos com os receptores opioides μ e δ .

Em relação ao receptor δ -opiode, o complexo formado pelo agonista seletivo DPI-287 possuiu escore mais negativo (-141,16) quando comparado ao formado pelo derivado tiofênico 7CN03 (-112,31) (Tabela 2, figura 6c,d).

A porção N,N-dietilbenzamida de DPI-287 é capaz de formar interações hidrofóbicas com os resíduos de Val281, Phe280, Trp284 e Leu300 (Quadro 1), enquanto a porção benzil forma interações por empilhamento pi-pi com Tyr308. Por fim, os grupos metila formam interações hidrofóbicas com M132, Tyr129, Ile304 e Tyr308 (Figura 6c).

O derivado 7CN03, por sua vez, forma o mesmo tipo de interação com Ala98, Met132, Val281 e Tyr308 (Quadro 1), mas contém ainda duas ligações carbono-

hidrogênio: uma entre o o hidrogênio da porção N,N-dimetilanilina de 7CN03 e Ser131 e outra entre a nitrila do tiofênico e Gly304 (Figura 6d).

Quanto aos complexos do receptor κ -opioide, aquele formado com o agonista MP1104 apresentou escore mais negativo (-138,26) comparado ao formado com 7CN03 (-107,28) (Tabela 2).

Quadro 2. Tipos de interações formadas entre ligantes e resíduos dos alvos analisados, destacando os resíduos comuns aos dois ligantes (negrito).

| Ligante | Pi-alquila | Empilhamento pi-pi | Ligação de hidrogênio | Ligação carbono-hidrogênio | Interações desfavoráveis | Pi-enxofre |
|----------------------------|--|-----------------------|-----------------------|--------------------------------|--------------------------|---------------|
| Receptor κ -opioide | | | | | | |
| 7CN03 | Val230, Trp287, His291, Ile294, Tyr320 | - | - | Lys227, Asp138, Tyr139 | - | Met142 |
| MP1104 | Val134, Leu135, Tyr139 Met142 , Cys210, Val230, Trp287, Ile294, Tyr320 | His291 | Asp138 | Thr111 | Tyr139 | - |
| Receptor TRPA1 | | | | | | |
| 7CN03 | Leu708, Arg975, Met978 | Trp711, Arg852 | - | - | - | - |
| AM-0902 | Leu707, Arg852 , Ile858, Val861, Ala971, Met978, Lys974, Arg975 , His983, Leu982 | Trp711, Gly857 | His983 | Leu707, Arg852 , Ala971 | - | - |

A análise das interações mostra contatos hidrofóbicos entre o grupo ciclopropilmetil de MP1104 e o anel aromático da cadeia lateral Tyr320 e Tyr287 (Figura 7a).

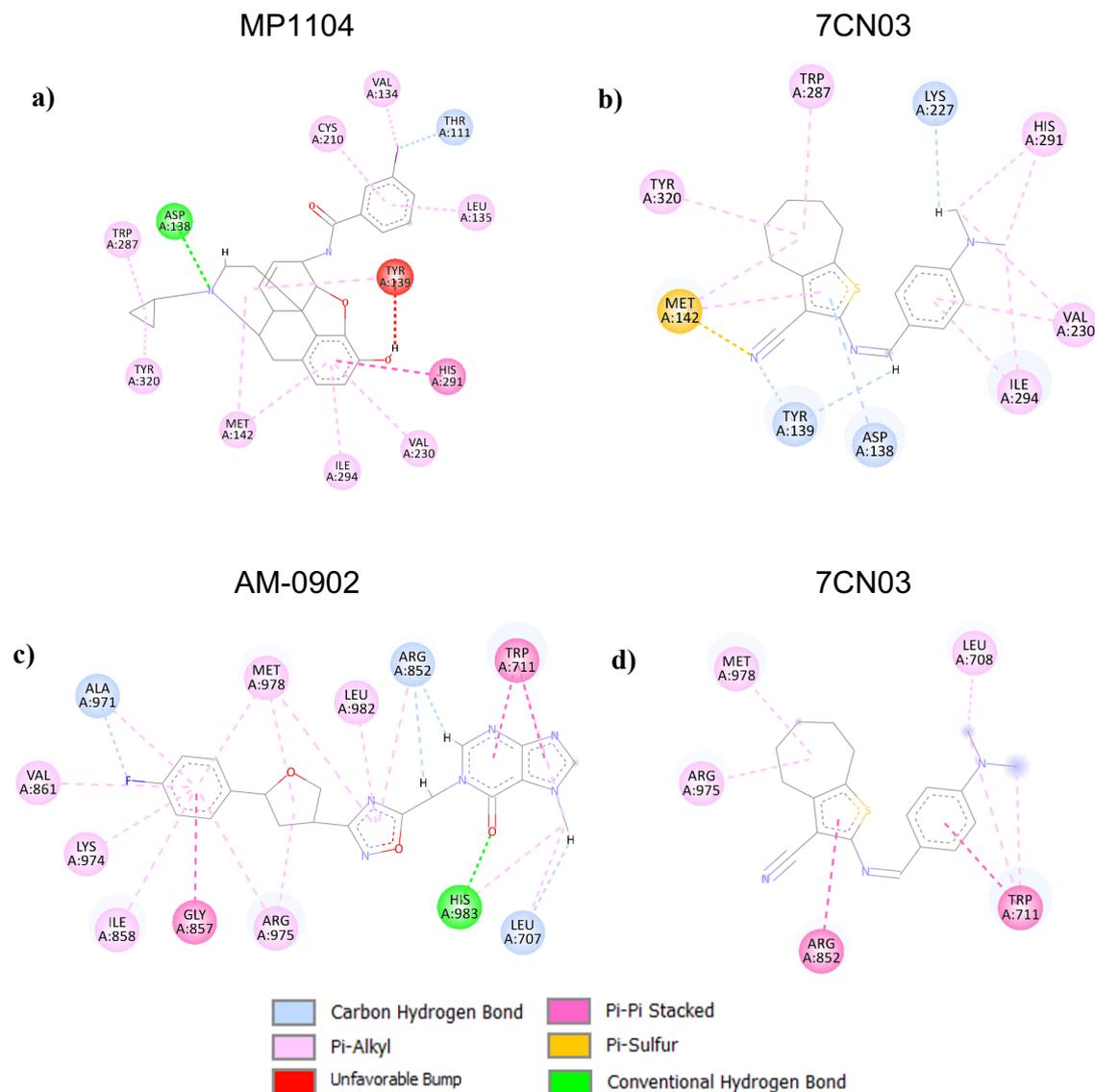


Figura 7. Interações formadas entre 7CN03 e controles positivos com os receptores κ -opioide e TRPA1.

O receptor TRPA1 formou um complexo muito mais estável com o antagonista AM-0902 (-195,21) comparado a 7CN03 (-134,28) (Tabela 2). AM-0902 forma ainda ligações de hidrogênio entre o oxigênio da porção hipoxantina e His983 e ligações carbono hidrogênio com hidrogênio dessa mesma porção com Arg852. Além disso, o flúor ligado ao anel benzênico também forma uma ligação carbono hidrogênio e uma interação pi-alkila (Figura 7c).

Por outro lado, 7CN03 forma apenas interações pi-alkila e empilhamento pi-pi, que somado à menor quantidade de interações comparado a AM-0902, podem explicar os valores de escore encontrados (Figura 7d).

Apesar de formar mais interações com o receptor TRPV1, especialmente por ligações de hidrogênio e pi-alquila (Quadro 3), o antagonista capsazepina formou um complexo com valor de escore semelhante a 7CN03: -85,05 para capsazepina e -87,79 para 7CN03 (Tabela 2).

Quadro 3. Tipos de interações formadas entre ligantes e resíduos dos alvos analisados, destacando os resíduos comuns aos dois ligantes (negrito).

| Ligante | Pi-alquila | Empilhamento pi-pi | Ligação de hidrogênio | Ligação carbono-hidrogênio | Interações desfavoráveis | Pi-enxofre |
|-------------|--|--------------------|--|--------------------------------------|--------------------------|---------------------------|
| TRPV1 | | | | | | |
| 7CN03 | Leu515, Leu553 , Leu669 | Tyr511 | - | Ser512 , Asn551 | - | Met547 , Phe587 |
| Capsazepina | Phe543, Ala546, Leu553, Leu662, Ala665 | - | Ser512 , Met547, Thr550, Asn551 , Glu570 | Tyr511 , Tyr554, Thr550 | - | Met547 |
| NMDAR | | | | | | |
| 7CN03 | - | - | Ala647 | Ala643, Thr648 | Thr646, Thr648 | - |
| Escetamina | Leu642, Val644 | - | Asn614, Asn615 | - | - | - |

O anel tiofênico de 7CN03 formou duas interações pi-enxofre: uma delas envolve o grupo sulfidril de Met547 e os elétrons pi do anel tiofênico, enquanto a outra ocorre entre o enxofre tiofênico e o anel benzênico de Phe587 (Figura 8b).

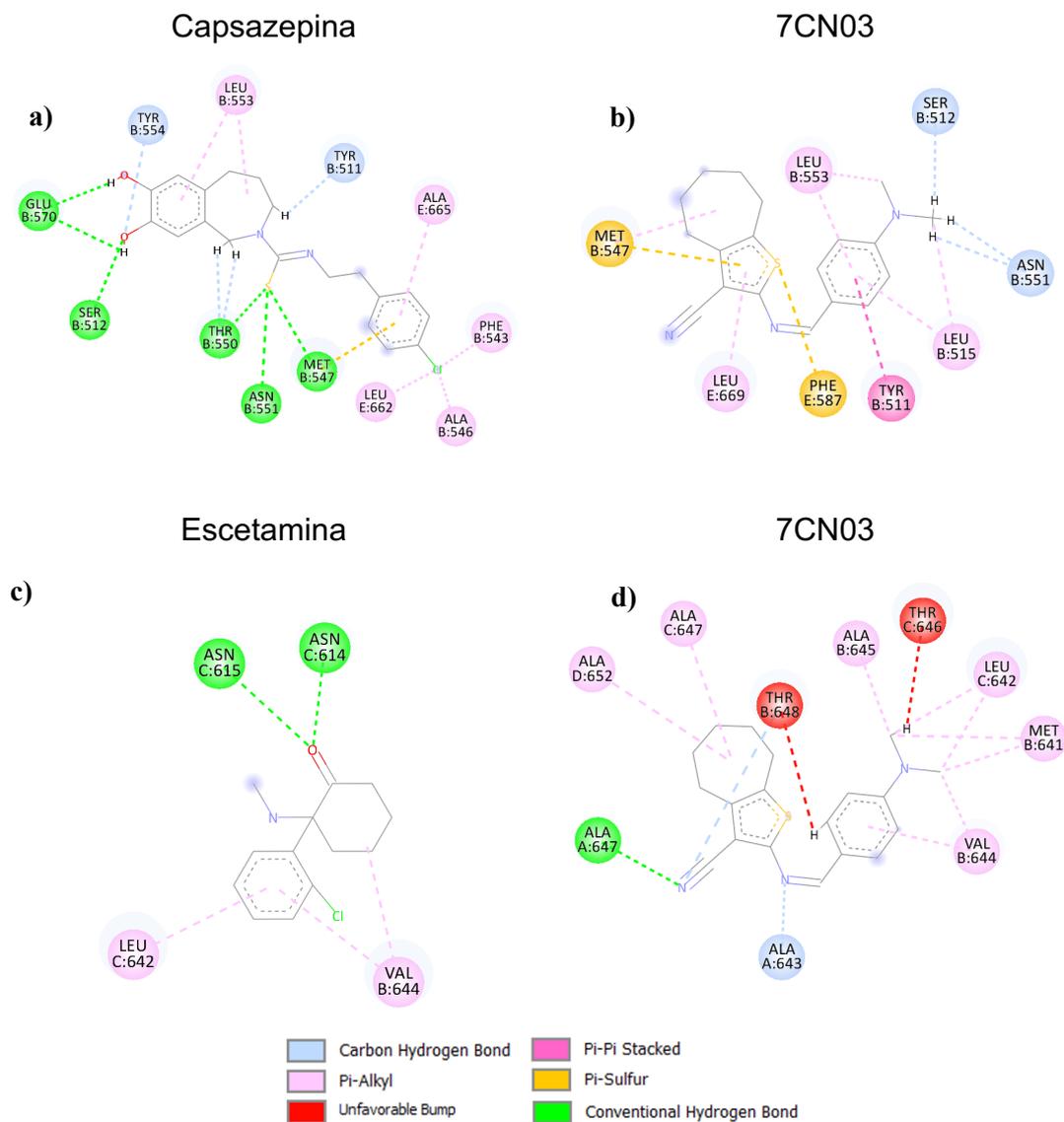


Figura 8. Interações formadas entre 7CN03 e controles positivos com os receptores TRPV1 e NMDAR.

Por fim, o complexo formado entre NMDAR e 7CN03 obteve escore mais negativo (-104,86) quando comparado ao formado com a escetamina (-80,87) (Tabela 2). Esses valores podem ser explicados por 7CN03 formar mais interações com o receptor, como uma ligação de hidrogênio entre o grupo nitrila e Ala647 e uma ligação carbono-hidrogênio entre a imina ligada ao anel tiofênico e Ala643. Apesar disso, há interações desfavoráveis entre 7CN03 e o alvo: uma entre o hidrogênio da porção N,N-dimetilbenzilamina de 7CN03 e Thr646 e outra entre o hidrogênio do anel benzênico e Thr648 (Figura 8c,d), que podem diminuir a estabilidade do complexo.

DISCUSSÃO

Os objetivos deste estudo foram avaliar os possíveis efeitos antinociceptivos do derivado tiofênico 7CN03 utilizando modelos nociceptivos orofaciais e sugerir alvos de ligação para obtenção do efeito apresentado. Os resultados obtidos a partir dos testes *in vivo* mostram atividade antinociceptiva orofacial, possivelmente relacionada com a interação entre a substância estudada e receptores opioides, glutamatérgicos e de potencial transitório vanilóide demonstrado no teste *in silico*.

O efeito antinociceptivo dos derivados tiofênicos pode ser atribuído a uma combinação das propriedades do anel tiofênico e dos substituintes acoplados a ele. O anel tiofênico é uma estrutura aromática que confere estabilidade química, lipofilicidade e capacidade de interação com alvos moleculares, incluindo proteínas e receptores envolvidos na nocicepção, como TRPV1, NMDA e receptores opioides. Além disso, sua conformação plana e eletronegatividade devido ao enxofre tornam o anel um núcleo favorável para interações π - π e ligações de hidrogênio, essenciais para a atividade farmacológica (Ismail et al., 2012).

Os substituintes no anel tiofênico são cruciais para modular a atividade antinociceptiva. Eles podem alterar a lipofilicidade e a biodisponibilidade do composto, influenciando a capacidade de atravessar membranas biológicas, como a barreira hematoencefálica. Podem ainda influenciar as interações específicas com receptores, enzimas e canais iônicos relacionados à dor e conferir propriedades adicionais, como atividade antioxidante, anti-inflamatória ou de estabilização de radicais livres, que complementam o efeito antinociceptivo (Shah e Verma, 2018).

Estudo prévio reportou que o rendimento do 7CN03 no processo de síntese é superior a 70%, o que indica aspecto positivo no sistema de produção laboratorial (Rodrigues et al., 2015). Neste estudo, o composto foi administrado por via oral, com uso de rigor metodológico para estimar uma amostra probabilística e implementação de um sistema de cegamento durante a condução dos ensaios. Isso representa uma importante estratégia para atender aos pressupostos da pesquisa translacional, que considera interlocução entre pesquisas básicas e clínicas, com foco em princípios científicos e operacionais subjacentes (Gilliland et al., 2019).

A susceptibilidade da região orofacial à dor aguda, decorrente de exposição a substâncias algogênicas sensibilizadoras dos receptores estudados (capsaicina,

formalina e glutamato) se faz uma estratégia interessante para a investigação farmacológica objetivando a descoberta de novas possibilidades terapêuticas (Nunes et al., 2024), especialmente se considerarmos que esses agentes algogênicos são reconhecidos por promoverem ativação de diferentes tipos de nociceptores.

A dor orofacial em humanos pode ser resultado de processos inflamatórios nos tecidos da região, como a pulpíte aguda e mucosite por exemplo, como também de alterações crônicas envolvendo articulações temporomandibulares e músculos. Sabe-se que os mecanismos de transmissão de estímulos nociceptivos ao nervo trigêmeo, se dá através de fibras A-delta e C presentes na região da face (Sessle, 2011). A interpretação da dor pelo sistema nervoso central a partir da ativação direta de nociceptores de fibras aferentes do tipo C, liberação de substância P e outros neuropeptídeos, caracteriza a fase neurogênica (Quintans-Júnior, 2010).

Uma das substâncias algogênicas utilizadas nos testes *in vivo* foi a formalina, substância capaz induzir a excitação de neurônios nociceptivos do núcleo trigeminal, estimulando fibras nociceptivas presentes na região orofacial após sua aplicação. Trata-se de um método de avaliação válido, confiável e bifásico, sendo dividido em uma primeira fase chamada fase neurogênica, e uma segunda fase chamada de fase inflamatória (Luccarini et al., 2006).

Na fase inflamatória, gerada devido à estimulação da medula espinal, após sensibilização dos nociceptores e neurônios centrais, ocorre a liberação de serotonina, histamina, prostaglandina E2 (PGE2), óxido nítrico (ON), aminoácidos excitatórios (glutamato e aspartato) e bradicinina (Silva et al., 2016). Investigação prévia demonstrou que derivados tiofênicos, com estruturas químicas semelhantes ao 7CN03, foram capazes de reduzir quantidade de citocinas inflamatórias, como IL-8, e apresentaram atividades antinociceptiva e anti-inflamatória (Mota, 2018; Ahmed et al., 2013).

A atividade antinociceptiva do 7CN03 pode ser associada à redução da dor inflamatória, mas particularmente à dor neurogênica, uma vez que melhores resultados foram obtidos na primeira etapa do teste. Estudos prévios reportaram que derivados tiofênicos RMD86 (25, 50 e 100 mg/kg) e RBF(3)K (5 mg/kg) são capazes de promover efeitos antinociceptivos nas duas fases do teste da formalina em camundongos (da Cruz et al., 2020; Oliveira et al., 2009).

Drogas de ação central atuam em ambas as fases do teste, enquanto drogas de ação periférica (por exemplo, AINEs) inibem apenas a segunda fase (Tomaz-Morais et al., 2017). Assim, os achados do presente estudo sugerem que o 7CN03 atua em ambas as fases. O efeito do composto na fase neurogênica, assim como o observado para a morfina, pode ser decorrente de interação do fármaco com receptores opióides, especialmente do tipo μ -opioide já que o estudo de docking molecular indicou predição de afinidade do 7CN03 a este receptor.

Segundo Zhuang et al. (2022), o ohmefentanil, um agonista potente do receptor μ -opioide, possui a capacidade de formar interações adicionais com os resíduos Tyr150 e Asp149, o que pode explicar o aumento da sua potência em comparação ao fentanil. O mesmo resíduo de aminoácido forma uma ligação carbono-hidrogênio entre a porção N,N-dimetilanilina de 7CN03 com o resíduo Tyr150, o que pode contribuir para a ativação desse receptor e um possível efeito antinociceptivo.

Sabe-se que mutações em Tyr320 reduzem fortemente a potência do MP1104, um ligante para receptor κ -opioide, para sinalização da proteína G (principalmente Gi), enquanto o mutante Tyr287 reduz seletivamente a potência de recrutamento de β -arrestina 2 do MP1104, proteína frequentemente associada a efeitos adversos como disforia, sedação e diminuição do limiar de recompensa, o que pode levar a sintomas semelhantes a depressão (Che et al., 2018). Neste estudo, observamos que esses resíduos formam os mesmos tipos de interação (pi-alquila) no complexo formado com 7CN03, sugerindo que esse composto possua atividade semelhante a MP1104 em relação à sinalização celular de proteínas G.

O resíduo M142, por sua vez, está localizado em um aglomerado aromático envolvido na ativação de vários receptores acoplados à proteína G (Katritch et al., 2013; Holst et al., 2010). Enquanto MP1104 forma interações pi-alquila, 7CN03 forma ligações mais fortes, do tipo pi-enxofre, entre o grupo nitrila do derivado tiofênico e o enxofre da cadeia lateral do aminoácido. Esses dados, novamente, sugerem que 7CN03 possa atuar na sinalização celular como MP1104.

O glutamato é um aminoácido com um importante papel na neurotransmissão excitatória e tem seus efeitos mediados por receptores ionotrópicos (NMDA e AMPA) ou metabotrópicos (mGluR). A ativação desses receptores promove modulação da adenosina monofosfato cíclico (AMPC), que desencadeia a propagação de impulsos nervosos pelo influxo de íon sódio. A rápida

transmissão sináptica ocorre a partir da ativação dos receptores ionotrópicos, pois eles estão associados à abertura de canais para íons Ca^{2+} (Ivanova et al., 2020; Nascimento et al., 2018). O estudo de ancoragem molecular fornece evidências de forte interação do 7CN03 pelo receptor NMDA. Foi possível ver a participação da porção N,N-dimetilanilina e do núcleo tiofênico de 7CN03 na formação de várias interações intermoleculares relevantes, sinalizando a importância desses dois grupos para uma possível atividade biológica.

Essa possível interação do 7CN03 com receptor NMDA contribui para explicar o efeito antinociceptivo observado, uma vez que o glutamato é capaz de excitar aferentes nociceptivos que suprem os tecidos musculoesqueléticos da face, gerando dor a partir de uma resposta nociceptiva de curta duração (Turner e Outhwaite, 2007; Chung e Ro, 2020). Consistentemente, segundo relato de Chung (2020), em humanos, a dor e a hiperalgesia mecânica induzidas pela injeção de glutamato no masseter são atenuadas pelo tratamento do masseter com cetamina, que bloqueia os receptores NMDA, indicando que os receptores NMDA periféricos contribuem para a inflamação, nocicepção e hiperalgesia nos músculos masseter.

A capsaicina (8-metil-N-vanil-trans-6-zonisamida) é uma substância química extraída da pimenta vermelha do gênero *Capsicum* capaz de excitar terminações nervosas a partir da ativação de receptores transitórios da família vaniloide, especialmente TRPV1, responsável por gerar uma sensação de calor nos neurônios, resultando em dor (Caterina et al., 1997).

O modelo de indução de nocicepção pela capsaicina é útil para estudar os mecanismos desencadeados pela nocicepção trigeminal, uma vez que imita a dor aguda após um estímulo nocivo. Essa substância quando aplicada à pele, músculos e outros tecidos demonstrou produzir inflamação e sensibiliza aferentes nociceptivos trigeminal e espinal, bem como neurônios do corno dorsal (Quintans-Júnior, 2010). Antagonistas de receptores vaniloides vêm sendo estudados em modelos de camundongos de mucosite ulcerativa oral, condição que causa dor intensa durante a alimentação e a fala, resultando em baixa qualidade de vida para pacientes com câncer submetidos à quimiorradioterapia (Hitomi et al., 2019).

É sabido que independentemente de como ocorre o efeito do fármaco, por ligação ou interação química, sua concentração no local da ação controla o efeito. Entretanto, a resposta à concentração pode ser complexa e é frequentemente não linear, foi o que observamos no teste da capsaicina, que indicou que o melhor efeito

antinociceptivo do 7CN03 ocorreu para a dose intermediária testada. Esse efeito pode ser explicado por fatores relacionados aos aspectos farmacocinéticos (Maurya e Subramaniam, 2010).

O efeito antinociceptivo do 7CN03 também pode ser atribuído a sua interação com o receptor TRPV1, que, quando ativado pela capsaicina, promove influxo de cátions e produz despolarização da membrana celular. A transmissão do impulso resultante dessa ativação pode ocorrer pela interação com vários mediadores, a exemplo das taquicininas, substância P, aminoácidos excitatórios, óxido nítrico e outros mediadores pró-inflamatórios (Waning et al., 2007). Derivados tiofênicos podem exercer seus efeitos antinociceptivos através de mecanismo de modulação do receptor TRPV1 (Aiello et al., 2016).

TRPV1 e TRPA1 são expressos em aproximadamente 25% e 10% dos aferentes masseteres (Chung e Ro, 2020). Além disso, estudo prévio sugere que a ativação do receptor TRPV1 na pele facial de ratos influenciam as respostas nociceptivas a estímulos térmicos e mecânicos cutâneos nocivos, induzindo alterações neuroplásticas no subnúcleo caudal do tronco cerebral trigeminal (Honda et al., 2008).

A análise *in silico* indicou predição de afinidade do 7CN03 com TRPV1, com valor de ligação próximo ao observado para o antagonista.

CONCLUSÃO

Nossos achados sugerem que o composto tiofênico 7CN03 apresenta efeito antinociceptivo orofacial, com provável alvo de ação envolvendo receptores opioides, glutamatérgicos e vanilóides.

REFERÊNCIAS

1. Matsuka Y. Orofacial Pain: Molecular Mechanisms, Diagnosis, and Treatment 2021. *Int J Mol Sci.* 2022 abr; 23(9):4826. <https://doi.org/10.3390/ijms23094826>.
2. Ananthan S, Benoliel R. Chronic orofacial pain. *J Neural Transm (Vienna)*. 2020 Apr;127(4):575-588. doi: 10.1007/s00702-020-02157-3.
3. Beirith A, Santos AR, Calixto JB. Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. *Brain Res.* 2002 Jan 11;924(2):219-28. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(01\)03240-1](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(01)03240-1).
4. Hargreaves KM. Orofacial pain. *Pain.* 2011 Mar;152(3 Suppl):S25-S32. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2010.12.024>.
5. Bindu S, Mazumder S, Bandyopadhyay U. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective. *Biochem Pharmacol.* 2020 Out; 180:114147. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114147>.
6. Upp LA, Waljee JF. The Opioid Epidemic. *Clin Plast Surg.* 2020 abr;47(2):181-90. <https://doi.org/10.1016/j.cps.2019.12.005>.
7. da Cruz RMD, Braga RM, de Andrade HHN, Monteiro ÁB, Luna IS, da Cruz RMD, Scotti MT, Mendonça-Junior FJB, de Almeida RN. RMD86, a thiophene derivative, promotes antinociceptive and antipyretic activities in mice. *Heliyon.* 2020 Nov 23;6(11):e05520. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05520>.
8. da Cruz RMD, Mendonça-Junior FJB, de Mélo NB, Scotti L, de Araújo RSA, de Almeida RN, de Moura RO. Thiophene-Based Compounds with Potential Anti-Inflammatory Activity. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2021 Jul 19;14(7):692. <https://doi.org/10.3390/ph14070692>.

9. Clélia A.X. Mota, Antônia R.S. Penha, Alisson M. Oliveira, Diogo V. Fonsêca, Ana K.H.L. Maia, Aldeíde O.B. Rocha, Ricardo O. Moura, Francisco J.B. Mendonça Junior, Liana C.M. Pordeus, Reinaldo N. Almeida, Margareth F.F.M. Diniz. A study of the Antinociceptive, Anti-Inflammatory, and Toxicological Activity of a Promising Thiophene Derivative. 2018 Latin American Journal of Pharmacy - 37 (3): 579-87.
10. Rodrigues KA, Dias CN, Nêris PL, Rocha Jda C, Scotti MT, Scotti L, Mascarenhas SR, Veras RC, de Medeiros IA, Keesen T de S, de Oliveira TB, de Lima Mdo C, Balliano TL, de Aquino TM, de Moura RO, Mendonça Junior FJ, de Oliveira MR. 2-Amino-thiophene derivatives present antileishmanial activity mediated by apoptosis and immunomodulation in vitro. Eur J Med Chem. 2015 1; 106:1-14. <http://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.10.011>.
11. da Cruz, Rayssa Marques Duarte. 2011. Synthesis, spectroscopic studies and bioassays of Artemia salina for determination of the cytotoxicity of new derivatives 2-[(4-diethylamino-benzylidene)-amino]-5,6,7,8-tetrahydro-4H-cyclohepta[b]thiophene-3-carbonitrile. Final paper (Bachelor's Degree in Biological Sciences). Universidade Estadual da Paraíba, João Pessoa/PB – Brazil. <http://dspace.bc.uepb.edu.br/jspui/handle/123456789/2902>.
12. Tomaz-Morais JF, Braga RM, de Sousa FB, de Sousa DP, deM Pordeus LC, de Almeida RN, de Castro RD. Orofacial antinociceptive activity of (S)-(-)-perillyl alcohol in mice: a randomized, controlled and triple-blind study. Int J Oral Maxillofac Surg. 2017 May;46(5):662-667. <https://doi.org/10.1016/j.ijom.2017.01.024>.
13. Quintans-Júnior LJ, Melo MS, De Sousa DP, Araujo AA, Onofre AC, Gelain DP, Gonçalves JC, Araújo DA, Almeida JR, Bonjardim LR. Antinociceptive effects of citronellal in formalin-, capsaicin-, and glutamate-induced orofacial nociception in rodents and its action on nerve excitability. J Orofac Pain. 2010 Summer;24(3):305-12.
14. CHEMAXON. MarvinSketch, versão 23.14 [software]. Budapest: ChemAxon, 2023. <https://chemaxon.com/products/marvin>.

15. WAVEFUNCTION, Inc. Spartan, versão 14 [software]. Irvine: Wavefunction, 2014. <https://www.wavefun.com/products/spartan.html>.
16. CLC BIO COMPANY. Molegro Virtual Docker, versão 6.0.1 [software]. 2013. <https://www.clcbio.com/products/molegro-virtual-docker/>.
17. DASSAULT SYSTÈMES. BIOVIA Dassault Systèmes. Discovery Studio Visualizer, v21.1.0.20298. [software]. 2019. <https://www.3ds.com/products-services/biovia/products/molecular-modeling-simulation/biovia-discovery-studio/>.
18. Hunskar S, Hole K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain*. 1987 Jul;30(1):103-114. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(87\)90088-1](https://doi.org/10.1016/0304-3959(87)90088-1).
19. Petrenko AB, Yamakura T, Baba H, Shimoji K. The role of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in pain: a review. *Anesth Analg*. 2003 Oct;97(4):1108-1116. <https://doi.org/10.1213/01.ANE.0000081061.12235.55>.
20. Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*. 1997 Oct 23;389(6653):816-24. <https://doi.org/10.1038/39807>.
21. Ismail MM, Kamel MM, Mohamed LW, Faggal SI, Galal MA. Synthesis and biological evaluation of thiophene derivatives as acetylcholinesterase inhibitors. *Molecules*. 2012 Jun 12;17(6):7217-31. <https://doi.org/10.3390/molecules17067217>.
22. Shah R, Verma PK. Therapeutic importance of synthetic thiophene. *Chem Cent J*. 2018 Dec 19;12(1):137. <https://doi.org/10.1186/s13065-018-0511-5>.
23. Gilliland et al. The Fundamental Characteristics of a Translational Scientist. *ACS Pharmacology & Translational Science* 2019 2 (3), 213-216. <https://doi.org/10.1021/acsptsci.9b00022>.

24. Nunes APL, Andrade HHN, Alves DN, Araújo GR, Salvadori MGSS, Almeida RR, et al. Orofacial antinociceptive activity of codeine-associated geraniol in mice: a controlled triple-blind study. *Braz oral res.* 2024; 38:e071. <https://doi.org/10.1590/1807-3107bor-2024.vol38.0071>.
25. Sessle BJ. Peripheral and central mechanisms of orofacial inflammatory pain. *Int Rev Neurobiol.* 2011; 97:179-206. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385198-7.00007-2>.
26. Luccarini P, Childeric A, Gaydier AM, Voisin D, Dallel R. The orofacial formalin test in the mouse: a behavioral model to study the physiology and modulation of trigeminal nociception. *J Pain.* 2006 Dec;7(12):908-14. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2006.04.010>.
27. Silva JC, Macedo LA, Souza GR, Oliveira-Junior RG, Lima-Saraiva SR, Lavor ÉM, et al. Efeito antinociceptivo orofacial do extrato etanólico de *Annona vepretorum* Mart. (Annonaceae). *Z Naturforsch CJ Biosci.* 2016; 71(7-8):209-14. <https://doi.org/10.1515/znc-2015-5024>.
28. Oliveira RA, Savegnago L, Jesse CR, Menezes PH, Molander GA, Nogueira CW. Toxicological investigation and antinociceptive property of potassium thiophene-3-trifluoroborate. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2009 Jun;104(6):448-54. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2009.00397.x>.
29. ZHUANG, Youwen et al. Molecular recognition of morphine and fentanyl by the human μ -opioid receptor. *Cell*, v. 185, n. 23, p. 4361-4375. e19, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.09.041>.
30. CHE, Tao et al. Structure of the nanobody-stabilized active state of the kappa opioid receptor. *Cell*, v. 172, n. 1, p. 55-67. e15, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.12.011>.
31. Katritch, V.; Cherezov, V.; Stevens, R. C. Structure-function of the G protein-coupled receptor superfamily. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, v. 53, p. 531-556, 2013. <https://doi.org.10.1146/annurev-pharmtox-032112-135923>.

32. Ivanova VO, Balaban PM, Bal NV. Modulation of AMPA receptors by nitric oxide in nerve cells. *Int J Mol Sci.* 2020 Feb;21(3):981. <https://doi.org/10.3390/ijms21030981>.
33. Chung MK, Ro JY. Peripheral glutamate receptor and transient receptor potential channel mechanisms of craniofacial muscle pain. *Mol Pain.* 2020 Jan-Dec; 16: 1744806920914204. <https://doi.org/10.1177/1744806920914204>.
34. Hitomi S, Ujihara I, Ono K. Pain mechanism of oral ulcerative mucositis and the therapeutic traditional herbal medicine hangeshashinto. *J Oral Biosci.* 2019 Mar;61(1):12-15. <https://doi.org/10.1016/j.job.2019.01.004>.
35. Maurya, MR, Subramaniam, S. Desafios Computacionais em Biologia de Sistemas. *Biomedicina de Sistemas.* 2010; 175–223. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-372550-9.00008-0>.
36. Waning J, Vriens J, Owsianik G, Stüwe L, Mally S, Fabian A, et al. Uma nova função dos canais TRPV1 sensíveis à capsaicina: envolvimento na migração celular. *Cálcio celular.* 2007 julho;42(1):17-25. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2006.11.005>.
37. Aiello F, Badolato M, et al. Design and Synthesis of New Transient Receptor Potential Vanilloid Type-1 (TRPV1) Channel Modulators: Identification, Molecular Modeling Analysis, and Pharmacological Characterization of the N-(4-Hydroxy-3-methoxybenzyl)-4-(thiophen-2-yl)butanamide, a Small Molecule Endowed with Agonist TRPV1 Activity and Protective Effects against Oxidative Stress. *ACS Chem Neurosci.* 2016 Jun 15;7(6):737-48. <https://doi.org/10.1021/acchemneuro.5b00333>.
38. Honda K, Kitagawa J, Sessle BJ, Kondo M, Tsuboi Y, Yonehara Y, Iwata K. Mechanisms involved in an increment of multimodal excitability of medullary and upper cervical dorsal horn neurons following cutaneous capsaicin treatment. *Mol Pain.* 2008 Nov 19;4:59. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-4-59>.

5. CONCLUSÃO

O composto tiofênico 7CN03 parece ser uma substância potencial para o desenvolvimento de formulações para o tratamento de condições de dor orofacial. Com os resultados obtidos na pesquisa, considera-se a hipótese de que o 7CN03 atua em receptores opioides, glutamatérgicos e vanilóides, sendo necessária a investigação destes mecanismos em futuros ensaios *in vivo*. A elucidação do mecanismo de ação e farmacocinética através de pesquisas futuras é de extrema importância para a compreensão do efeito farmacológico e posterior avaliação de sua eficácia em ensaios clínicos para definição do perfil de aplicação dessa substância.

REFERÊNCIAS

Ananthan S, Benoliel R. Chronic orofacial pain. *J Neural Transm (Vienna)*. 2020 Apr;127(4):575-588. doi: 10.1007/s00702-020-02157-3.

Beirith A, Santos AR, Calixto JB. Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. *Brain Res*. 2002 Jan 11;924(2):219-28. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(01\)03240-1](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(01)03240-1).

Benítez-Angeles M, Morales-Lázaro SL, Juárez-González E, Rosenbaum T. TRPV1: Structure, Endogenous Agonists, and Mechanisms. *Int J Mol Sci*. 2020 May 12;21(10):3421. doi: 10.3390/ijms21103421.

Bindu S, Mazumder S, Bandyopadhyay U. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective. *Biochem Pharmacol*. 2020 Oct; 180:114147. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114147>.

Chung MK, Ro JY. Peripheral glutamate receptor and transient receptor potential channel mechanisms of craniofacial muscle pain. *Mol Pain*. 2020 Jan-Dec; 16:1744806920914204. <https://doi.org/10.1177/1744806920914204>.

Clélia A.X. Mota, Antônia R.S. Penha, Alisson M. Oliveira, Diogo V. Fonsêca, Ana K.H.L. Maia, Aldeíde O.B. Rocha, Ricardo O. Moura, Francisco J.B. Mendonça Junior, Liana C.M. Pordeus, Reinaldo N. Almeida, Margareth F.F.M. Diniz. A study of the Antinociceptive, Anti-Inflammatory, and Toxicological Activity of a Promising Thiophene Derivative. *2018 Latin American Journal of Pharmacy - 37 (3): 579-87*.

da Cruz RMD, Braga RM, de Andrade HHN, Monteiro ÁB, Luna IS, da Cruz RMD, Scotti MT, Mendonça-Junior FJB, de Almeida RN. RMD86, a thiophene derivative, promotes antinociceptive and antipyretic activities in mice. *Heliyon*. 2020 Nov 23;6(11):e05520. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05520>.

da Cruz RMD, Mendonça-Junior FJB, de Mélo NB, Scotti L, de Araújo RSA, de Almeida RN, de Moura RO. Thiophene-Based Compounds with Potential Anti-Inflammatory Activity. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2021 Jul 19;14(7):692. <https://doi.org/10.3390/ph14070692>.

Dhaliwal A, Gupta M. Fisiologia, Receptor Opioide, em: StatPearls, StatPearls Publishing, Treasure Island (FL). 2023.

Fracassi B, Barini R, Tadine RM, Barbosa NC. Visão integrativa da dor em seu aspecto biopsicossocial. REVISA. 2023; 12(2):246-9. Doi: <https://doi.org/10.36239/revisa.v12.n2.p246a249>.

Golan, David E. Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

Häggman-Henrikson B, Alstergren P, Davidson T, Högestätt ED, Östlund P, Tranaeus S, et al. Pharmacological treatment of oro-facial pain - health technology assessment including a systematic review with network meta-analysis. J Oral Rehabil. 2017 Oct;44(10):800-26. <https://10.1111/joor.12539>.

Hanada T. Receptores de glutamato ionotrópicos na epilepsia: uma revisão com foco nos receptores AMPA e NMDA. Biomoléculas. 2020; 10(3):464. <https://doi.org/10.3390/biom10030464>.

Hargreaves KM. Orofacial pain. Pain. 2011 Mar;152(3 Suppl):S25-S32. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2010.12.024>.

Jornal Dor (Publicação da Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor - Ano XVIII - 2º Trimestre de 2020 - edição 74, 11-8.

Joury E, Bernabe E, Gallagher JE, Marcenes W. Burden of orofacial pain in a socially deprived and culturally diverse area of the United Kingdom. Pain. 2018 Jul;159(7):1235-43. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001203>

Labanca M, Gianò M, Franco C, Rezzani R. Orofacial Pain and Dentistry Management: Guidelines for a More Comprehensive Evidence-Based Approach. Diagnostics (Basel). 2023 Sep 4;13(17):2854. <https://doi.org/10.3390/diagnostics13172854>.

Lahsasni, S.; Al-Hemyari, DAM; Ghabbour, HA; Mabkhoot, YN; Aleanizy, FS; Alothman, AA; Almarhoon, ZM Synthesis, characterization and antibacterial and anti-inflammatory activities of novel pyrimidine and thiophene derivatives. Chemistry. 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/8536063>.

Limeira, R. R. T., Dantas, N. V., Tomaz-Morais, J. F., Costa, T. K. V. L. da, Braga, R. M., Sousa, F. B., Scotti, L., Salvadori, M. G. da S. S., Almeida, R. N. de., & Castro, R. D.. (2022). Orofacial antinociceptive effects of perillyl alcohol associated with codeine and its possible modes of action. *Brazilian Oral Research*, 36, e109. <https://doi.org/10.1590/1807-3107bor-2022.vol36.0109>.

Martins RT, de Almeida DB, do R Monteiro FM, Kowacs PA, Ramina R. Opioid receptores para data, *Rev Dor*. 2012; 13: 75-79.

Marwaha, L., Bansal, Y., Singh, R. *et al*. Canais TRP: alvo potencial de fármacos para dor neuropática. *Inflammopharmacol*, 24, 305–317 (2016). <https://doi.org/10.1007/s10787-016-0288-x>.

Matsuka Y. Orofacial Pain: Molecular Mechanisms, Diagnosis, and Treatment 2021. *Int J Mol Sci*. 2022 abr; 23(9):4826. <https://doi.org/10.3390/ijms23094826>.

Nasry WHS, Martin CK. Intersecting Mechanisms of Hypoxia and Prostaglandin E2-Mediated Inflammation in the Comparative Biology of Oral Squamous Cell Carcinoma. *Front Oncol*. 2021 May 21;11:539361.

Pinzi L, Rastelli G. Molecular Docking: Mudando paradigmas na descoberta de fármacos. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019; 20(18):4331. <https://doi.org/10.3390/ijms20184331>.

Prozzi GR, Cañas M, Urtasun MA, Buschiazzo HO, Dorati CM, Mordujovich-Buschiazzo P. Riesgo cardiovascular de los antiinflamatorios no esteroideos. *Medicina (B Aires)*. 2018;78(5):349-355. Spanish. PMID: 30285927.

Rachinger-Adam B, Conzen P, Azad SC. Farmacêutica-ecologia dos receptores opioides periféricos. *Opinião atual Anestesiologia*, 24: 408 – 413, 2011. <https://doi.org/10.1097/ACO.0b013e32834873e5>.

Raja SN, Carr DB, Cohen M, Finnerup NB, Flor H, Gibson S, et al. The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. *Pain*. 2020; 23. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001939>.

Rocha APC, Kraychete DC, Lemonica L, Carvalho LR de, Barros GAM de, Garcia JB dos S, et al. Dor: aspectos atuais da sensibilização periférica e central. *Revista Brasileira de Anestesiologia*. 2007; Jan; 57(1):94–105.

Sadighparvar S, Al-Hamed FS, Sharif-Naeini R, Meloto CB. Preclinical orofacial pain assays and measures and chronic primary orofacial pain research: where we are and where we need to go. *Front Pain Res (Lausanne)*. 2023 May 24;4:1150749. <https://doi.org/10.3389/fpain.2023.1150749>. PMID: 37293433; PMCID: PMC10244561.

Santos PS, Martins-Júnior PA, Paiva SM, Klein D, Torres FM, Giacomini A, et al. Prevalência de dor dentária autorreferida e fatores associados entre escolares brasileiros de oito a dez anos. *PLoS One*. 2019 abr;14(4): e0214990. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214990>.

Sessle BJ. Peripheral and central mechanisms of orofacial pain and their clinical correlates. *Minerva Anestesiologia*. 2005 Apr;71(4):117-36.

Shaefer JR, Khawaja SN, Bavia PF. Sex, Gender, and Orofacial Pain. *Dent Clin North Am*. 2018 Oct;62(4):665-682. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2018.06.001>.

Sharma, S.; Monga, V.; Kumar, B. Recent advances in the development of heterocyclic anti-inflammatory agents. *Medicinal Chemistry* 2020.

Sherrington CS. Qualitative difference of spinal reflex corresponding to qualitative difference of cutaneous stimulus. *Journal of Physiology* 1903, 30(1): 39 – 46, 1903. Doi: <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1903.sp000980>.

Shenoy SS, Lui F, Biochemistry, Endogenous Opioids, in: *StatPearls*, StatPearls Publishing, Treasure Island (FL). 2022.

Silva, PR. Investigação do efeito ansiolítico-símile e antidepressivo-símile do monoterpeno tetraidrolinalol por meio de abordagens in silico e in vivo / Tese de doutorado. João Pessoa, 2023. 123 f.

Sneddon LU. Comparative Physiology of Nociception and Pain. *Physiology (Bethesda)*. 2018 Jan 1;33(1):63-73. doi: 10.1152/physiol.00022.2017. PMID: 29212893.

Tomaz-Morais JF, Braga RM, de Sousa FB, de Sousa DP, deM Pordeus LC, de Almeida RN, de Castro RD. Orofacial antinociceptive activity of (S)-(-)-perillyl alcohol in mice: a randomized, controlled and triple-blind study. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2017 May;46(5):662-667. <https://doi.org/10.1016/j.ijom.2017.01.024>.

Torres PHM, Sodero ACR, Jofily P, Silva-Jr FP. Key Topics in Molecular Docking for Drug Design. *Int J Mol Sci.* 2019 Sep 15;20(18):4574.

Upp LA, Waljee JF. The Opioid Epidemic. *Clin Plast Surg.* 2020 apr; 47(2):181-90. <https://doi.org/10.1016/j.cps.2019.12.005>

Yuriev E, Ramsland PA. Latest developments in molecular docking: 2010-2011 in review. *J Mol Recognit.* 2013 May;26(5):215-39.

ANEXO

Certidão de aprovação do CEUA.



Universidade
Federal da
Paraíba



Universidade Federal da Paraíba

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito antinociceptivo orofacial do derivado 2-aminotiofênico (7CN03) e elucidação de seu possível mecanismo de ação.", protocolada sob o CEUA nº 7123201123 (ID 002074), sob a responsabilidade de **Ricardo Dias de Castro e equipe; Allesson Jamesson da Silva; Adriana Maria Fernandes de Oliveira Golzio** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB) na reunião de 20/12/2023.

We certify that the proposal "Orofacial antinociceptive effect of the 2-aminothiophene derivative (7CN03) and elucidation of its possible mechanism of action.", utilizing 186 Heterogenics mice (males and females), protocol number CEUA 7123201123 (ID 002074), under the responsibility of **Ricardo Dias de Castro and team; Allesson Jamesson da Silva; Adriana Maria Fernandes de Oliveira Golzio** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Paraíba (CEUA/UFPB) in the meeting of 12/20/2023.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **03/2024** a **02/2025** Área: **Ciências Farmacêuticas**

Origem: **Centro de Bioterismo da Universidade Estadual da Paraíba**

Espécie: **Camundongos heterogênicos** sexo: **Machos e Fêmeas** idade: **2 a 3 meses** Quantidade: **186**

Linhagem: **Mus musculus - Swiss** Peso: **20 a 30 g**

João Pessoa, 20 de dezembro de 2023

Prof. Dr. Luiz Henrique César Vasconcelos
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

Profa. Dra. Gláucia Veríssimo Faheina Martins
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

