

LEONARDO RIGOLDI BONJARDIM

Cirurgião-Dentista

***EFEITO DO TRAMADOL E DIPIRONA NAS RESPOSTAS
COMPORTAMENTAIS . NOCICEPTIVAS INDUZIDAS PELA
ADMINISTRAÇÃO DE ÓLEO DE MOSTARDA NA ATM DE RATOS.***

Dissertação apresentada à
Faculdade de Odontologia de
Piracicaba da Universidade
Estadual de Campinas, para
obtenção do título de Mestre
em Odontologia, área de
concentração Fisiologia Oral.

Piracicaba-SP
2001

i
UNICAMP

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

LEONARDO RIGOLDI BONJARDIM

Cirurgião-Dentista

**EFEITO DO TRAMADOL E DIPIRONA NAS RESPOSTAS
COMPORTAMENTAIS NOCICEPTIVAS INDUZIDAS PELA
ADMINISTRAÇÃO DE ÓLEO DE MOSTARDA NA ATM DE RATOS.**

Este exemplar foi devidamente corrigido,
de acordo com a Resolução CCPG-036/83
CPG, 21/01/2002


Assinatura do Orientador

Dissertação apresentada à
Faculdade de Odontologia de
Piracicaba da Universidade
Estadual de Campinas, para
obtenção do título de Mestre
em Odontologia, área de
concentração Fisiologia Oral.

**Orientadora: Profa. Dra. Maria Cecília Ferraz de Arruda Veiga
FOP-UNICAMP**

**Banca Examinadora:
Profa. Dra. Maria Beatriz Duarte Gavião
Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva
Profa. Dra. Maria Cecília Ferraz de Arruda Veiga**

Piracicaba-SP

2001

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	UNICAMP
	B642e
V	EX
TOMBO BCI	48230
PROF	16.837/02
PREÇO	R\$ 41,00
DATA	16/04/02
Nº CPD	

CM00166250-1

118 ID 236339

Ficha Catalográfica

B642e Bonjardim, Leonardo Rigoldi.
 Efeito do tramadol e dipirona nas respostas comportamentais nociceptivas induzidas pela administração de óleo de mostarda na ATM de ratos. / Leonardo Rigoldi Bonjardim. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2001.
 viii, 82f. : il.

Orientadora : Profª Drª Maria Cecília Ferraz de Arruda Veiga.
 Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Articulação temporomandibular. 2. Dor. 3. Analgésicos. I. Veiga, Maria Cecília Ferraz de Arruda. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marilene Girello CRB/8-6159, da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de MESTRADO, em sessão pública realizada em 13 de Dezembro de 2001, considerou o candidato LEONARDO RIGOLDI BONJARDIM aprovado.

1. Profa. Dra. MARIA CECILIA FERRAZ ARRUDA VEIGA

A handwritten signature in dark ink, appearing to read "Maria Cecilia Ferraz Arruda Veiga", written over a horizontal line.

2. Prof. Dr. CARLOS ALBERTO DA SILVA

A handwritten signature in dark ink, appearing to read "Carlos Alberto da Silva", written over a horizontal line.

3. Profa. Dra. MARIA BEATRIZ DUARTE GAVIAO

A handwritten signature in dark ink, appearing to read "Maria Beatriz Duarte Gaviao", written over a horizontal line.

DEDICATÓRIA

“Esta tese é dedicada a um grande amigo, **GUILHERME**, que o tempo me fará encontrar um dia. Mesmo sem você estar fisicamente presente em nossas vidas, eu sei que está torcendo por mim”.

Aos meus pais:

“A vocês, agradeço pela vida, pela força, pelos exemplos, pelo amor e por me darem a chance de fazer o que mais gosto. Enfim, obrigado por tudo, eu só agradeço a Deus por vocês existirem”.

Aos meus tios, Douglas e Sílvia:

“A vocês, é difícil expressar minha gratidão, não só por terem me dado moradia, mas também pelo amor e respeito com que me trataram. Podem ter certeza de que ficarão guardados para sempre no meu coração”.

Aos meus avós:

“A essas quatro pessoas que Deus me deu e continuará me dando por muito tempo, obrigado pelo amor, confiança e carinho”.

Aos meus irmãos:

“Leandro e Letícia, eu gostaria de dizer que torço muito pelo sucesso de vocês, e agradeço por serem pessoas tão especiais de que tanto me orgulho”.

À minha namorada:

“SOL, obrigado por ter me dado tanta força nos momentos mais difíceis que não foram poucos, e também pelo amor que tanto me incentivou. Te Amo!”

Aos meus tios e tias:

“Não citarei nomes pois são muitos, mas quero que saibam o quanto sou agradecido por Deus ter me dado uma família tão especial e que só pensa no sucesso de todos”.

Aos meus primos:

“Espero que Deus ilumine o caminho de todos vocês, e que possam ser muito felizes e bem sucedidos tanto profissionalmente quanto pessoalmente”.

Ao sogro, sogra e cunhada:

“Obrigado pelos momentos agradáveis os quais passei com vocês, e que me auxiliaram e muito, para poder seguir em frente”.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

“À Maria Cecília F. de Arruda Veiga, grande pessoa com a qual convivi dois anos especiais de minha vida, obrigado pela confiança, paciência, exemplo e tranquilidade com que me ensinou”.

“À Cláudia Herrera Tambeli e Fernanda Klein Marcondes”.

“Ao Prof. Dr. Eduardo Dias de Andrade, que tanto me ajudou em todos os momentos solicitados. Obrigado pela prestatividade e ensinamentos”.

“A todos do departamento de fisiologia oral, muito obrigado”.

“Aos grandes amigos de todas as horas, Franco e Alexandre, obrigado pelos momentos maravilhosos que passamos e por me ajudarem em todos os momentos. Vocês serão inesquecíveis”.

“Ao Dany, Edu, Marcelo, Ana Paula e Daniela, amigos não menos importantes, obrigado por tudo e desculpem-me se em algum momento eu os magoei”.

“A você, Gabriel, grande amigo, que você consiga tudo que for importante para sua felicidade. Sucesso!”.

“À Renata, Rafael, Fernanda, Toninho (Antônio), Tia Dore, Zuí, Cássia, Neto (XV), Érica, Gabriela e Seu Hilário, obrigado pelas tardes e noites maravilhosas”.

“Às bibliotecárias Maria Helena e Heloísa pela ajuda em todos os momentos.”

“À Faculdade de Odontologia de Piracicaba.”

“À CAPES, que, com seu apoio financeiro, permitiu esta pesquisa”.

SUMÁRIO

	Páginas
LISTA DE ABREVIATURA	01
RESUMO	03
ABSTRACT	05
1 INTRODUÇÃO	07
2 REVISÃO DE LITERATURA	10
2.1 Vias Neurais da dor orofacial	10
2.2 Mediadores Químicos da Dor e Inflamação	16
2.3 Agente Inflamatório: ÓLEO de MOSTARDA	18
2.4 Teste Comportamental	21
2.5 Tratamentos Farmacológicos para Disfunção da ATM	22
2.6 Dipirona	25
2.7 Tramadol	30
3 MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1 Animais	34
3.2 Teste comportamental	34
3.3 Soluções e Doses Empregadas	36
3.4 Grupos experimentais	37
3.5 Análise estatística	38
4 RESULTADOS	40

5 DISCUSSÃO	
6 CONCLUSÕES	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
ANEXO	63
APÊNDICE	75
	77

Lista de Abreviaturas

AAS – Ácido acetilsalicílico

AINES – Antiinflamatórios não-esteroidais

ATM – Articulação temporomandibular

BK – Bradicinina

CGRP – Gene relacionado ao Peptídeo da Calcitonina

CNT - Controle

CO – Coçar a Região Orofacial

Di - Dipirona

DTMs – Disfunções temporomandibulares

EP – Erro padrão médio

GRÁF. - Gráfico

h – Horas

H⁺ - Hidrogênio

HI - Histamina

i.p. – Intraperitoneal

K – Potássio

Kg – Quilograma

LC – Levantar a Cabeça rapidamente

min – Minuto

mg – Miligrama

NA – Noradrenalina

NMDA – N – metil – D - aspartato

NTET – Núcleo do Trato Espinhal do Trigêmio

OM – Óleo de Mostarda

PG – Prostaglandina

Qx 314 – 2% - quaternário hidrofílico derivado da lidocaína

SC – Subnúcleo Caudal

SCP – substância cinzenta periaquedutal

SE – Serotonina

s - Segundos

SEC – Sensibilização Central

SEP – Sensibilização Periférica

SI – Subnúcleo Interpolar

SNC – Sistema Nervoso Central

SO – Subnúcleo Oral

SP – Substância P

TAB. - Tabela

TNL – Terminações Nervosas Livres

Tr – Tramadol

VM – Porção ventomedial da medula

RESUMO

Embora sejam uma importante entidade clínica, as desordens da Articulação Temporomandibular (ATM), representam um problema de difícil tratamento, e principalmente, causam enorme desconforto e geralmente inflamação seguida de dor. Portanto, o desenvolvimento e a padronização de modelos experimentais que possibilitem o estudo dos mecanismos fisiológicos envolvidos nesse tipo específico de condições dolorosas são de grande relevância. Para isso, 50 μ L de óleo de mostarda (OM) (1,5%, 2,5% e 4,5%) ou seu veículo óleo mineral foram administrados na região da ATM direita de ratos e as respostas comportamentais nociceptivas caracterizadas pelo ato de coçar a região orofacial (CO) e levantar rapidamente a cabeça (LC) foram quantificadas por 45 minutos. A administração periarticular de OM produziu respostas comportamentais nociceptivas estatisticamente significativas a partir da concentração de 2,5% em relação à de óleo mineral. Com o intuito de confirmar o caráter nociceptivo das respostas comportamentais induzidas pela administração de OM na ATM, foram realizados grupos experimentais adicionais, nos quais o QX-314 (quaternário hidrofílico derivado da lidocaína) - 2% (25 μ L) foi co-administrado com o OM (5% -25 μ L) e a morfina foi administrada via intraperitoneal (i.p.) 30 minutos antes da administração do OM (2,5% - 50 μ L) na região da ATM. A seguir para se verificar o efeito de drogas analgésicas nessas respostas

nociceptivas foram administradas, via i.p., dipirona (19; 57; 95mg/kg) e tramadol (5; 7,5; 10mg/kg) 30 minutos antes da administração de OM 2,5%. Os resultados indicam que o OM quando injetado diretamente na ATM de ratos é capaz de desencadear respostas comportamentais nociceptivas que são significativamente reduzidas pela co-administração de QX-314 – 2% e pela administração i.p. de morfina, e que este modelo comportamental é sensível aos analgésicos tramadol e dipirona, os quais reduziram de maneira dose dependente as respostas comportamentais nociceptivas avaliadas nesta pesquisa.

ABSTRACT

Although they are an important clinical entity, Temporomandibular disorder (TMD), causing a lot of discomfort and usually inflammation followed by pain, requires very complex treatment. Therefore, the development and the standardization of experimental models that make the study of physiologic pain mechanisms possible are of great relevance. For this, 50 μ L of 1.5%, 2.5% and 4.5% mustard oil (MO), as well as its vehicle, the mineral oil, was administered in the right temporomandibular joint (TMJ) of rats. Nociceptive behavioral responses characterized by the rat's both rubbing the orofacial region and flinching their heads quickly were quantified for 45 minutes. When compared to mineral oil administered in the periarticular region, MO showed nociceptive behavioral responses (statistically significant) starting at a concentration of 2.5%. With the intention of confirming the nociceptive character of the behavioral responses induced by the administration of MO in TMJ, two experimental groups were tested: group 1 - 25 μ L of QX 314 at 2% (derived from the lidocaine) co-administered with 5% MO (25 μ L); group 2 - morphine was intraperitoneally (i.p.) administered 30 minutes before the administration of 2.5% MO (50 μ L). In order to verify the effect of analgesic drugs on behavioral responses, dipyrone (19; 57; 95mg/kg) and tramadol (5; 7.5; 10mg/kg) were administered (i.p.) 30 minutes before the administration of 2,5% MO. Results in the present study show that when rats were injected with MO directly into the TMJ, nociceptive behavioral responses could be observed and these responses were significantly reduced by the co-administration of QX-314 at 2% and by the

administration of morphine. Also, this behavioral model was sensitive to the analgesic tramadol and dipyrone, which reduced the nociceptive behavioral responses in dependent dose appraised in this research.

1 INTRODUÇÃO

Tem sido demonstrado que 32% de todos os adultos irão sofrer de disfunção craniomandibular, sendo de relevância o fato de que 70% destes casos serem acompanhados de dor (ALDER *et al.*, 1992). Ainda com relação a isto, IRVING *et al.* (1999) relatam que a síndrome dolorosa da disfunção da ATM, é a ocorrência mais comum na região orofacial ficando apenas atrás da dor de dente.

Mesmo com sua importância clínica, esse tipo de patologia ainda é pouco compreendida pela maioria dos profissionais, fato este que pode explicar a ineficiência no tratamento dessas disfunções. Tão logo, é de relevância o estudo da dor proveniente dos região craniomandibular. A partir da década de 90, houve uma grande proliferação de modelos de estudo em animais, tentando imitar ao máximo as condições clínicas de dor ocorridas em humanos (REN & DUBNER, 1999b).

Para estudar os mecanismos dolorosos, diversos agentes irritantes têm sido utilizados. Dentre os agentes algésicos químicos utilizados, temos a formalina, o kaolin, a carragenina, o óleo de mostarda (OM), o fator ativador plaquetário, serotonina (WHEELER-ACETO *et al.*, 1989). O OM (alil isotiocianato dissolvido em óleo mineral), por sua vez possui uma série de vantagens, e sua administração nos tecidos produz uma inflamação do tipo neurogênica (DONNERER, *et al.*, 1991), é um estimulante direto de fibras C,

e possui, características específicas de um agente inflamatório, efetividade cientificamente comprovada, efeito relativamente rápido, favorecendo e simplificando os procedimentos experimentais (HASS *et al.*, 1992).

WOOLF & WALL (1986) verificaram que a administração de OM 20%, no tecido periarticular do joelho de rato, induzia uma atividade reflexa por 25 a 90 minutos. Outros autores como MACMAHON & ABEL (1987) demonstraram a infiltração de neutrófilos polimorfonucleares 1 h após a instilação de OM 2,5% na bexiga de ratos.

YU *et al.* (1995), em um trabalho de pesquisa, demonstraram que a aplicação de OM na ATM de ratos promove um aumento da atividade eletromiográfica dos músculos masséter e digástrico, e, que esse aumento é bloqueado pelo pré-tratamento do animal com lidocaína.

HARTWIG *et al.* (1996) relataram que a aplicação do agente irritante OM na ATM de ratos, induz um aumento significativo das respostas comportamentais nociceptivas quando comparadas às do grupo controle no qual foi injetado óleo mineral (veículo), sendo que a morfina reduz o número de comportamentos nociceptivos, de maneira dose-dependente.

Já ISHIKAWA *et al.* (1999), em um estudo para verificar o papel de um indutor do fator de crescimento neuronal na hiperalgesia induzida pelo OM, demonstraram que aplicação de OM na pata de ratos causa um aumento gradual no movimento de retirada da pata injetada e que esse

comportamento nociceptivo foi completamente bloqueado pelo pré-tratamento do animal com morfina.

Sabendo então, que o desenvolvimento de modelos experimentais para o estudo da dor em animais, são uma alternativa de grande valia e relevância (MIAMPAMBA *et al.*, 1993), e que o tratamento das disfunções crâniomandibulares frequentemente envolve farmacoterapia (BEREITER & BEREITER, 2000), o objetivo dessa pesquisa foi:

- Padronizar um modelo comportamental para estudo da dor proveniente dos tecidos craniomandibulares através da administração de OM em diferentes concentrações;
- Verificar se as respostas comportamentais induzidas pela administração de OM na região da ATM de ratos são de caráter nociceptivo, através da administração de analgésicos clássicos, sulfato de morfina (4mg/kg – 10ml/kg) e Qx 314-2%;
- Testar o efeito do tramadol e dipirona nesse modelo comportamental de dor.

2 Revisão de Literatura

2.1 Vias neurais para Dor Orofacial

A dor é o principal motivo pelo qual o paciente procura o tratamento odontológico. De acordo com a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), a dor é definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada à injúria tecidual real ou potencial, ou descrita nesses termos (ZIMMERMAN, 1983).

A dor proveniente da região orofacial corresponde a mais de 25% dos casos de queixas de dor (SESSLE, 1987), sendo a síndrome dolorosa da articulação temporomandibular (ATM) a ocorrência mais comum na região orofacial, ficando apenas atrás da “dor de dente” (IRVING *et al.*, 1999).

Na maioria das vezes, a dor é precedida por injúria tecidual, que pode ocorrer por trauma na ATM, exodontia dental, entre outros. A reação natural do organismo frente a um trauma é uma resposta de proteção local, evitando uma destruição ainda maior e ao mesmo tempo, um alerta para o cérebro do perigo eminente, através da inflamação e dor respectivamente (COOPER, 1990).

As terminações nervosas livres (TNL) na face e na boca determinam a base periférica para dor. Muitas TNL atuam como nociceptores,

constituindo os receptores ou órgãos sensitivos que respondem a estímulos nocivos mecânicos, térmicos, químicos e elétricos (SESSLE, 1986).

As TNL, as quais ocorrem em todos os tecidos craniofaciais incluindo pele, mucosa oral, ATM, polpa dental, periodonto, periósteo e músculos são associadas com algumas fibras aferentes de pequeno diâmetro, de condução lenta, cujo corpo celular se localiza no gânglio trigeminal (SESSLE, 1996). Essas fibras aferentes nociceptivas correspondem às fibras C, que são fibras de 0,3 a 3µm de diâmetro, amielinizadas de velocidade de condução 0,5 a 2m/s e às fibras A-delta, de 2 a 5µm de diâmetro, mielinizadas com velocidade de condução de 5 a 30m/s (AGHABEIGI, 1992).

Os nociceptores quando ativados, por qualquer estímulo nocivo, enviam ao Sistema Nervoso Central (SNC), informações sensoriais e discriminativas sobre as características espacial e temporal do estímulo, que são essenciais para discernir sua qualidade, intensidade, duração e localização (SESSLE, 1996).

Na região orofacial as fibras nociceptivas ativadas penetram no SNC através da ponte e fazem sinapse com neurônios localizados no núcleo do trato espinhal do trigêmeo (NTET), que é subdividido de rostral para caudal em subnúcleo oral (SO), interpolar (SI) e caudal (SC) (Sessle, 1995).

Segundo SESSLE (1986), após atingir o NTET, as informações sensoriais podem ser levadas diretamente para o tálamo e córtex cerebral ou indiretamente para a formação reticular.

O SC estende-se até a medula espinhal, onde se funde ao corno dorsal da mesma e, embora os componentes rostrais do NTET (SO e SI) também estejam implicados em mecanismos nociceptivos orofaciais relatados especialmente para dor intraoral e perioral (RABOISSON *et al.*, 1995), o SC tem sido considerado como a principal região de transmissão da informação nociceptiva dos tecidos craniofaciais superficiais e profundos (TSAI *et al.*, 1999).

Por suas similaridades morfológicas e fisiológicas com o corno dorsal espinhal (DUBNER, 1986) o SC tem sido designado como corno dorsal medular (HU *et al.*, 1981)

O SC contém neurônios nociceptivos (HU, 1990), alguns dos quais podem ser ativados por estimulação elétrica ou agentes algésicos químicos na ATM e outros tecidos profundos; muitos desses neurônios podem ser ativados no tálamo posterior, o que indica seu envolvimento nos caminhos nociceptivos ascendentes (SESSLE *et al.*, 1995). Na verdade, existe uma abundância de aferências de pequeno diâmetro suprimindo a ATM e músculos mastigatórios e muitas dessas aferências se projetam para o SC (SESSLE & HU, 1991) .

O SC possui dois tipos de neurônios nociceptivos: os nociceptivos específicos que respondem somente a estímulos nocivos, e os convergentes ou multirreceptivos, que respondem tanto a estímulos nocivos como mecânicos (YU *et al.*, 1993).

Os neurônios nociceptivos do SC parecem apresentar uma ampla convergência proveniente de tecidos profundos e cutâneos. Portanto, a extensiva convergência de impulsos da ATM e de músculos mastigatórios para os neurônios nociceptivos cutâneos no SC pode explicar a difícil localização e a dor referida e prolongada, típica das condições dolorosas que envolvem tecidos profundos como a ATM e a musculatura associada (TSAI *et al.*, 1999).

Além do SC apresentar um papel crucial na transmissão da informação nociceptiva, como dito acima, ele está criticamente envolvido na expressão das respostas reflexas nociceptivas. O aumento da atividade eletromiográfica que ocorre nos músculos de abertura e fechamento bucal, em decorrência de um estímulo doloroso na ATM, sugere que as informações nociceptivas da ATM podem ativar neurônios no SC, os quais, através das suas conexões com os centros reflexos do tronco cerebral, desencadeiam uma coativação dos músculos agonistas e antagonistas que pode servir para limitar os movimentos mandibulares em condições patofisiológicas, afetando os músculos e a ATM (HU *et al.*, 1997; SESSLE, 1996).

Além do SC, o SI também parece estar envolvido no processamento da informação nociceptiva proveniente da região orofacial, e tem sido demonstrado que o SI contém neurônios com características nociceptivas semelhantes àsquelas no SC (RO & CAPRA, 1999).

Considerando que a expressão da proteína c-Fos pode ser utilizada para examinar áreas que recebem impulsos sensoriais nocivos, HATHAWAY *et al.*, (1995), utilizaram a injeção do estimulante seletivo de fibras de pequeno diâmetro, óleo de mostarda, dentro da região da ATM, para quantificar o número e distribuição dos neurônios dentro do núcleo espinal trigeminal, e mostrou que os neurônios Fos-positivo eram vistos em regiões discretas do núcleo espinal trigeminal caudal, incluindo o pólo ventrolateral do núcleo de transição entre o SI e SC.

O SO, localizado na parte mais rostral do NTET, também representa um elemento importante no processamento da dor orofacial, e pode estar especialmente envolvido nos mecanismos nociceptivos intra-orais e periorais (SESSLE, 1995).

Estudos feitos por HUOPANIEMI *et al.* (1992), sobre a atividade neuronal do SO em resposta a estimulação elétrica de dentes de gatos anestesiados, e comparando as características eletrofisiológicas dos neurônios do SO com os do SC e SI, mostraram que a maioria dos neurônios

sensitivos do SO apresentavam limiares de resposta menores e um período de latência mais curto do que os do SC e SI.

Outros estudos eletrofisiológicos têm demonstrado que os SC e SO parecem exercer funções distintas no processamento da informação nociceptiva no NTET, sendo que o SC parece estar mais envolvido no processo de dor inflamatória tônica e/ou nos estados hiperalgésicos centrais do que o SO (RABOISSON *et al.*, 1995).

Do NTET, a informação nociceptiva proveniente da região orofacial é conduzida na sua projeção espino-talâmica ao tálamo ventrobasal e daí ao córtex somatossensorial, sendo estas responsáveis pelo componente sensorial discriminativo da dor, enquanto que, as aferências que se projetam para o tálamo medial e deste para o córtex frontal, estão relacionadas com o componente afetivo da dor (AGHABEIGI, 1992).

Estudos têm demonstrado que a ativação de vias nociceptivas especializadas no Sistema Nervoso Periférico e corno dorsal nem sempre produz dor. Há evidências de que essas vias estão sujeitas à considerável modulação por sistemas de controle descendentes extrínsecos de áreas cerebrais superiores, influenciando nas experiências comportamentais de dor em humanos (DUBNER & BENNETT, 1993).

2.2 Mediadores químicos da Dor e Inflamação

Para que ocorra o processamento da informação nociceptiva, uma série de mudanças ocorre no local do trauma ou injúria tecidual. Uma grande quantidade de mediadores químicos são liberados na área da injúria tecidual. Dentre eles, temos a bradicinina (BK), liberada por lesão vascular que tem mostrado um potente efeito pró-inflamatório, sendo uma das mais potentes substâncias endógenas indutoras de dor (SWIFT *et al.*, 1998), íons potássio (K) das células rompidas, histamina (HI) liberada a partir dos mastócitos, serotonina (SE) de plaquetas, substância P (SP) dos terminais axônicos e Prostaglandinas (PG) derivadas do ácido araquidônico. Esses mediadores quando aplicados localmente ativam fibras de pequeno diâmetro e produzem dor; As PG facilitam a dor evocada por estímulos químicos e físicos, mas por si só são relativamente ineficazes em evocar dor; A SP é encontrada em algumas fibras de pequeno diâmetro e podem ser liberadas das terminações nervosas nos tecidos periféricos (SESSLE, 1996).

Esses mediadores, promovem uma série de mudanças como o aumento da permeabilidade capilar, e o extravasamento plasmático, excitam e sensibilizam os nociceptores aferentes primários, promovem a irradiação da dor e a subsequente inflamação do tecido subjacente, processo conhecido como sensibilização periférica (SEP) (HU *et al.*, 1994). A SEP é responsável pela hiperalgesia, que é o aumento da dor frente a estímulos

dolorosos, e pela alodínea, que é a dor em resposta a estímulos normalmente não-nocivos (CODERRE *et al.*, 1993; FILLINGIM *et al.*, 1998).

Os sinais nervosos iniciados nas áreas de injúria tecidual conduzem informações nociceptivas, que provocam mudanças no SNC, contribuindo para amplificação e persistência da dor. Essas mudanças são referidas como sensibilização central (SEC) e envolvem um aumento na excitabilidade dos neurônios do corno dorsal da medula espinhal causado por uma cascata de eventos, incluindo despolarização neuronal, remoção do bloqueio magnésio voltagem-dependente dos receptores N-metil – D - aspartato (NMDA), mudanças na excitabilidade celular, entrada de cálcio nos neurônios e uma potencialização na transmissão sináptica. Essas mudanças também incluem ativação de outros receptores envolvendo aminoácidos excitatórios ionotrópicos e metabotrópicos, neuropeptídeos como SP, neurotrofinas e kinases envolvidas no processo de fosforilação (REN & DUBNER, 1999a).

Esse mecanismo de SEC é similar ao de SEP, pois, como já mencionado, ocorre um aumento na liberação de mediadores químicos na sinapse entre as aferências nociceptivas primárias e os neurônios de segunda ordem no SC, aumentando a excitabilidade neuronal, diminuindo o limiar a estímulos mecânicos e aumentando a atividade espontânea (HU *et al.*, 1994; SESSLE, 1995)

2.3 ÓLEO DE MOSTARDA: Agente inflamatório

Dentre os problemas que acometem a região orofacial, as desordens da ATM representam um problema de difícil tratamento e, principalmente, causam enorme desconforto e, geralmente, inflamação seguida de dor.

Segundo TOMAZZI (1988), os mecanismos dolorosos que acometem a ATM são um dos problemas mais difíceis e intrigantes com que se depara o cirurgião dentista, tendo em vista a grande dificuldade e subjetividade de se estudar a dor em humanos.

Dessa forma, o desenvolvimento de modelos experimentais para o estudo da dor em animais, é uma alternativa de grande valia e relevância (MIAMPAMBA *et al.*, 1993).

Dentre os métodos mais utilizados para quantificação da dor em animais experimentais incluem-se o eletrofisiológico, que consiste no registro da atividade neuronal, o eletromiográfico, no qual se realiza o registro da atividade muscular e o comportamental, que analisa as variáveis comportamentais, frente a diferentes estímulos, sendo o único que permite uma análise resultante da integração do SNC como um todo.

Têm sido descritos na literatura vários agentes irritantes capazes de induzir injúria tecidual e dor. Dentre esses, temos: óleo de mostarda (OM),

formalina, kaolin, serotonina, fator ativador plaquetário, carragenina (WHEELER-ACETO *et al.*, 1989).

O OM é um algésico químico que pode provocar dor e outros comportamentos nociceptivos quando aplicados na pele ou em tecidos profundos como a ATM (WOOLF & WALL, 1986; HANDWERKER *et al.*, 1991; HARTWIG *et al.*, 1996).

O OM produz uma inflamação do tipo neurogênica que compreende vasodilatação, extravasamento plasmático e ativação celular (DONNERER *et al.*, 1991; INOUE *et al.*, 1997). O OM apresenta uma série de vantagens por ser um estimulante direto de fibras C, possuir características específicas de um agente inflamatório, induzir ativação de proteínas c-fos vias nociceptivas espinhais em ratos (MUNRO *et al.*, 1993; SOYGUDER *et al.*, 1994), efetividade cientificamente comprovada, efeito relativamente rápido favorecendo e simplificando os procedimentos experimentais (HASS *et al.*, 1992).

O OM promove a ativação de neurônios sensoriais que contêm neuropeptídeos, incluindo as taquininas, o peptídeo relacionado ao gene calcitonina (CGRP) e a substância P (HOLZER, 1988). Os neuropeptídeos apresentam um papel patofisiológico importante na inflamação neurôgênica da pele e de vias aéreas.

A presença de fibras nervosas contendo SP e CGRP têm sido demonstrado na vasculatura da pele (GIBBINS *et al.*, 1987).

A aplicação de OM na ATM resulta em uma resposta inflamatória aguda nos tecidos, na expressão c-fos, aumento reversível na excitabilidade dos neurônios nociceptivos no subnúcleo caudal e uma ativação reflexa dos músculos de abertura e fechamento bucal. Em contraste a aplicação de óleo mineral na ATM induz pequena ou nenhuma mudança na atividade neuronal e na atividade dos músculos mandibulares (YU *et al.*, 1993; YU *et al.*, 1994; HATHAWAY *et al.*, 1995; YU *et al.*, 1995; YU *et al.*, 1996).

Os mecanismos fisiológicos envolvidos no processamento da informação nociceptiva proveniente da ATM podem também ser estudados através de técnicas comportamentais.

O OM tem sido amplamente utilizado para estudo da dor inflamatória na ATM de ratos (YU *et al.*, 1996; TAMBELI *et al.*, 1997).

HARTWIG *et al.* (1996), utilizando-se de um teste comportamental, relatam que a aplicação de OM 20% na ATM de ratos induz um aumento significativo das respostas comportamentais nociceptivas quando comparadas às do grupo controle em que foi injetado óleo mineral (veículo), e o analgésico de ação central, a morfina, reduziu o número de comportamentos nociceptivos de uma maneira dose-dependente.

Também tem sido relatado o uso tópico de OM na pata de ratos para quantificar a resposta reflexa por ele induzida (JIANG & GEHART, 1998).

2.4 O TESTE COMPORTAMENTAL

O teste comportamental utilizando-se do agente irritante formalina, tem sido descrito amplamente na literatura. DUBUISSON & DENNIS, (1977) quantificaram o período de tempo que o animal lambe a pata e o número de vezes que o animal levanta rapidamente a pata em que foi injetada formalina.

CLAVELOU *et al.* (1989), modificando o modelo já citado acima, administraram formalina na região subcutânea do lábio superior de ratos, e quantificaram a resposta comportamental nociceptiva caracterizada pelo ato de coçar a região orofacial, desenvolvendo um modelo para estudar os mecanismos dolorosos da região orofacial.

HARTWIG *et al.* (1996) desenvolveram um modelo experimental através da administração de OM a 20% na região da ATM de ratos, para estudo das respostas comportamentais nociceptivas.

ROVERONI *et al.* (2001) desenvolveram um modelo experimental através da administração de formalina na região da ATM de ratos, para estudo das respostas comportamentais nociceptivas. Nesse estudo, ficou demonstrado que a administração de formalina na ATM de ratos promove a

exacerbação dos comportamentos de coçar a região orofacial e levantar rapidamente a cabeça.

Os métodos de quantificação das respostas comportamentais observados nos testes citados acima, possuem limitações inerentes, que incluem a subjetividade do observador e as potenciais interações entre os comportamentos.

O teste comportamental apresenta variáveis como sexo, espécie, idade, estresse, temperatura ambiente que devem ser rigorosamente controladas para que os resultados obtidos sejam confiáveis.

WHEELER-ACETO & COWAN (1993) sugerem que uma inesperada diminuição em um único índice nociceptivo, como lambe ou elevar rapidamente a pata injetada, pode ser um critério inadequado para mostrar antinocicepção.

2.5 Tratamentos Farmacológicos para Disfunções da ATM

Desordens da ATM representam uma família de condições que, frequentemente, se apresentam como dor difusa acompanhada de limitação do movimento mandibular (DWORKIN *et al.*, 1990; DENUCCI *et al.*, 1996).

As bases para dor recorrente das desordens temporomandibulares não são conhecidas; no entanto a natureza dos sintomas sugerem uma

disfunção nervosa central. Esses sintomas incluem dor referida para outras áreas, baixos limiares (MAIXNER *et al.*, 1998), e persistentes alterações das funções endócrinas e autonômicas (CLARK *et al.*, 1980).

Intervenção farmacológica no tratamento da dor crônica orofacial é usualmente considerado coadjuvante ao tratamento definitivo (DIONNE, 1997).

Vários agentes farmacológicos com efeitos analgésicos e antiinflamatórios são usados na tentativa de diminuir a dor.

Os medicamentos podem ser usados para o tratamento dos sintomas iniciais e quando usados para as disfunções temporomandibulares (DTMs) são similares àqueles aplicados para outras condições dolorosas músculoesqueléticas. Dentre esses temos os opióides, drogas antiinflamatórias não-esteroidais (AINES), drogas miorelaxantes, analgésicos e baixas doses de antidepressivos.

Em um estudo feito por EKBERG, KOPP & AKERMAN (1996), utilizando 32 pacientes com dor localizada na ATM, 50mg de diclofenaco de sódio (Voltaren) era dado 2 ou 3 vezes por dia e era comparado com o placebo. A escala análogica visual foi usada para estimar se o tratamento com voltaren diminuiu a dor. A frequência de dor na ATM mostrou uma maior redução da dor no grupo com voltaren em relação ao grupo placebo; mostrou uma diminuição da dor à palpação nos músculos mastigatórios quando

comparados ao grupo placebo. Os autores consideram que o diclofenaco de sódio poderia ser usado como complemento para outros tratamentos de dor aguda na ATM.

A identificação do sítio de ação dos analgésicos têm sido tema de estudo por mais de 100 anos, e até hoje é motivo de controvérsia para vários desses fármacos. Destes estudos se chegou a conclusão que a percepção da dor pode ser inibida por um efeito nos receptores da dor (nociceptores), por um efeito ao nível central nos sistemas que processam a informação de dor, ou por ambas as alternativas (ZIMMERMANN, 1983).

Os impulsos nociceptivos da periferia podem ser aumentados por vários fatores, incluindo, sensibilização dos nociceptores por estímulos nocivos repetidos, diminuição do limiar dos nociceptores por substâncias algésicas, respostas reflexas provocada pela injúria tecidual (SESSLE, 1995).

O dano tecidual causado por injúria, libera substâncias algésicas químicas endógenas, dentro do fluído extracelular, nas áreas subjacentes aos nociceptores, as quais têm uma grande importância qualitativa e quantitativa na produção da inflamação e ativação das fibras aferentes. Dentre essas substâncias temos, hidrogênio (H^+), potássio (K), serotonina (SE), bradicinina (BK), histamina (HI), prostaglandinas (PG), substância P (SP), e, muitas outras. Dessas, SE, K, H^+ , PG, e outros membros da cascata

do ácido araquidônico estão nos tecidos, cininas estão no plasma e SP, está nos terminais nervosos (SESSLE, 1995).

Embora alguns desses mediadores químicos possam agir diretamente nas proteínas do canal iônico da membrana celular para mudar a permeabilidade e excitabilidade celular, para a maioria dos pesquisadores, as interações químicas ocorrem pela ativação dos receptores de membrana os quais são usualmente, mas não exclusivamente, associados à reguladores intermediários como as G-proteínas e segundos mensageiros (DRAY, 1995).

Esses impulsos dolorosos gerados na periferia por uma cascata de reações, incluindo a ação dos mediadores químicos, penetram no SNC, promovendo a sensibilização dessa área, através da liberação de mediadores químicos endógenos na sinapse entre o neurônio de primeira e segunda ordem (DRAY, 1995).

Para tentar impedir a propagação do impulso nociceptivo ou alterar a percepção dolorosa no SNC, tem sido utilizada a terapia analgésica e dentre as drogas mais utilizadas estão os opióides e os AINES.

2.6 DIPIRONA

A dipirona é um analgésico não-narcótico que não apresenta ação antiinflamatória. Foi introduzida na terapia clínica em 1922, sendo registrada

no Brasil em 1923 para o tratamento de diferentes estados de dor. Esse analgésico é um derivado pirazolona, altamente solúvel em água, permitindo o preparo de formas galênicas líquidas, tais como gotas e soluções injetáveis. Após administração oral, a dipirona é rapidamente absorvida de maneira uniforme e quase que completa. Diferentemente do ácido acetilsalicílico, a dipirona liga-se muito fracamente às proteínas plasmáticas e tem ação prolongada. Possui meia vida plasmática de aproximadamente 7 horas, com biodisponibilidade maior 90%.

Tem sido considerado como um antiinflamatório não-esteroidal de ação periférica (LORENZETTI & FERREIRA, 1985; BROGDEN, 1986), embora uma ação antinociceptiva central também tenha sido descrita (NEUGEBAUER *et al.*, 1994; LAIRD, ROSA & OLIVAR, 1998).

LORENZETTI & FERREIRA (1985) utilizaram-se de um teste nociceptivo e outro edematogênico, em ratos, pelo qual a hiperalgesia era induzida pela injeção intra-plantar de prostaglandina E2, isoprenalina, Db-c monofosfato de adenosina e cloreto de cálcio, em doses que proporcionavam o mesmo grau ou intensidade de hiperalgesia. Foram avaliados os efeitos do ácido acetil salicílico, dipirona, 4-metilaminoantipirina, indometacina, cloridrato de morfina e paracetamol. Os resultados desses ensaios suportaram a sugestão dos autores que o mecanismo de ação da dipirona é diferente daqueles das clássicas drogas antiinflamatórias não esteroidais. Embora o local de ação seja periférico, o seu efeito analgésico não decorre

da inibição da síntese de prostaglandinas, mas é exercido diretamente bloqueando a hiperalgesia inflamatória. Os autores sugeriam que a dipirona pode atuar de duas maneiras: inibindo a ativação da adenilciclase pelas substâncias hiperalgésicas e/ou causando o bloqueio direto do influxo de cálcio dentro dos nociceptores. Nesse mesmo trabalho, os autores relatam que uma dose de 19 mg/kg i.p. de dipirona era necessária para bloquear a hiperalgesia, enquanto que foi necessário uma dose bem superior, 180 mg/kg i.p., para bloquear o edema. Essa ausência de efeito anti-edematoso na presença de significante antinocicepção na resposta inflamatória induzida por carragenina poderia sugerir que a analgesia estivesse relacionada a um efeito central da dipirona. No entanto a administração sistêmica de dipirona, em contraste com a morfina, foi incapaz de antagonizar hiperalgesia induzida por Db-AMP, descartando a possibilidade de ação central nesse modelo experimental.

Estudos de VASQUEZ & VANEGAS (2000) demonstraram que microinjeção de analgésicos não opióides, como a dipirona, dentro da substância cinzenta periaquedutal em ratos, causou inibição da nocicepção na corda espinhal. Após um estímulo nocivo nos respectivos campos receptivos, as respostas dos neurônios multirreceptivos espinhais eram inibidas por microinjeção de dipirona dentro da substância cinzenta periaquedutal (SCP), a qual era revertida por microinjeção de naloxona dentro da porção ventromedial da medula (VM), sugerindo que a dipirona

inibe a nocicepção pela ativação dos mecanismos descendentes opióides na SCP e VM.

AGUIRRE-BANUELOS & GRANADOS-SOTO (1999) demonstraram que a administração local de doses efetivas de dipirona e morfina, no local onde a nocicepção era induzida por injeção intraplantar de formalina 1% na pata direita de rato, produzia um efeito antinociceptivo dose-dependente. Nesse mesmo estudo, quando combinadas, doses não efetivas de morfina (1.25microg) e dipirona (100microg) produziram um efeito antinociceptivo significativo em relação às drogas administradas isoladamente e/ou ao grupo controle (salina). Em um estudo para elucidar se a dipirona induzia antinocicepção na simples preparação da unidade motora, em ratos normais versus ratos com monoartrites induzidas por carragenina, mostrou um potente efeito antinociceptivo nos dois grupos, e também que o efeito antinociceptivo era induzido tanto nas áreas periféricas quanto central, ao nível da medula espinhal (MAZARIO & HERRERO, 1999).

MUKHERJEE & SOOD (1980) em um estudo controlado, realizado com 267 pacientes com dores pós-episiotomia, avaliaram a eficácia analgésica do tratamento oral de dipirona em comparação com ácido acetil salicílico (AAS) e placebo. O alívio da dor com dipirona foi mais rápido e mais elevado que com o AAS.

DAFTARY *et al.* (1980), também avaliando o emprego da dipirona e paracetamol em mulheres com dor pós-episiotomia, verificaram que durante todo o período de observação a eficácia analgésica da dipirona foi notadamente superior à do paracetamol.

GOMES-GIMENES *et al.* (1980) avaliaram o emprego da dipirona e paracetamol em odontologia, em casos de dor pós-cirúrgica dentária, num total de 90 pacientes. A dipirona produz um alívio da dor mais rápido e duradouro num maior número de pacientes do que o paracetamol.

PLANAS *et al.* (1998), em um estudo comparando a eficácia analgésica da dipirona 1e 2g com ibuprofeno (600mg) e placebo no pós-cirúrgico de extração de terceiros molares inferiores sob anestesia local de mepivacaina, num total de 253 pacientes, mostraram que 1g de dipirona é tão efetivo quanto 600 mg de ibuprofeno e que a eficácia analgésica da dipirona é dose-dependente.

Para avaliar as possíveis relações entre agranulocitose e dipirona, de 1980 até 1984, foi realizado o Estudo de Boston, do qual participaram 40 investigadores de diversos países supervisionados por uma Junta Consultiva Honorária Internacional. Casos de agranulocitose eram definidos em pacientes com contagem de granulócitos de $< 500/\text{mm}^3$ ou de leucócitos de $< 3000/\text{mm}^3$. Dentre os dados obtidos, podemos citar que na Suécia onde a comercialização da dipirona é proibida de venda desde 1978 a incidência de

agranulocitose foi superior à média total e ao índice apresentado por países com alto consumo de dipirona.

2.7 TRAMADOL

A primeira experiência clínica com tramadol nos EUA ocorreu em 1969, quando SUNSHINE *et al.* (1970), citado por SUNSHINE (1994), compararam três doses de tramadol (50, 100 ou 150mg) com dextropropoxifeno (65 ou 130mg) e no controle da dor pós-operatória, dor pós-fratura e dor musculoesquelética em pacientes. Embora a sua utilização data da década de 70, somente recentemente foi aprovado nos Estados Unidos.

Tramadol representa uma única classe de analgésicos para reduzir a dor. É rapidamente absorvido após administração oral com biodisponibilidade de 68%, eliminado por via renal, com meia-vida biológica de aproximadamente 5,5 horas. É metabolizado principalmente por desmetilação e sucessiva conjugação com ácidos glicurônicos e sulfúricos, sendo que dos 11 metabólitos identificados, o O-Desmetiltramadol (M1) é o único metabólito farmacologicamente ativo. Apresenta moderada afinidade pelos receptores morfínicos μ e fraca afinidade pelos receptores δ e κ , agindo portanto sobre o sistema de receptores opióides, além do que bloqueia a recaptação de serotonina (SE) e de noradrenalina (NA), agindo

portanto sobre o sistema de receptores monoaminérgicos (RAFFA *et al.*, 1992). Este efeito tardio predomina sobre a ação opióide. O caminho neuronal monoaminérgico origina-se nas regiões medulares do cérebro e medula espinhal descendente para modular e atenuar a dor nos tratos ascendentes da periferia e corno dorsal da medula espinhal. Nessas vias estão envolvidos transmissores monoaminérgicos SE e NA, que reduzem ou inibem a propagação dos impulsos nociceptivos dentro dos tratos ascendentes (WYNN, 1996).

A redução da dor por tramadol através do aumento de SE e NA é consistente com a atividade de antidepressivos tricíclicos na redução da dor crônica.

Na literatura clínica, o tramadol é referido como um analgésico opióide atípico. O tramadol é convertido no fígado em metabólito M1, o qual é produzido por demetilação. Esse metabólito M1, tem melhor afinidade com os receptores opióides e contribui para a ação analgésica do tramadol (HENNIES *et al.*, 1988).

Tramadol foi inicialmente relatado com fraca seletividade para os receptores opióides (HENNIES *et al.*, 1988), portanto não é uma substância controlada e não vista como aditiva.

Estudos em animais experimentais, utilizando o antagonista morfínico naloxona, para verificar qual o envolvimento do sistema opióide na

analgesia produzida pelo tramadol, mostraram dados conflitantes (RAFFA *et al.*, 1992). Além do mais, o pré-tratamento com yohimbina e idazoxan (antagonistas monoaminérgicos) pode reduzir significativamente o efeito antinociceptivo do tramadol em ratos (KAYSER *et al.*, 1992). Resultados semelhantes foram obtidos em voluntários saudáveis, nos quais o efeito analgésico central do tramadol foi apenas parcialmente bloqueado por naloxona, mas quase que totalmente inibido por yohimbina, portanto confirmando um mecanismo de ação analgésico dual (DAYER, COLLART & DESMEULES, 1994).

MEHLISCH *et al.* (1990), em um estudo controlado de analgesia em 250 pacientes após extrações de molares, relataram que a administração de 150mg de tramadol foi mais efetiva que de 75mg e 60mg de codeína, de 650/100mg de paracetamol/dextropropoxifeno, ou de placebo.

MOROZ *et al.* (1991) estudaram a efetividade do tramadol para alívio da dor dental, e demonstraram que em doses acima de 2,5mg/kg de tramadol (via oral) produz considerável alívio da dor em casos de periodontite crônica, alveolites e pulpites.

Estudos sobre o efeito analgésico do tramadol, tem mostrado a sua efetividade após cirurgias dentárias (VOORHEES *et al.*, 1992; COLLINS *et al.*, 1997; SUNSHINE, 1994); outros trabalhos também demonstraram a eficácia do tramadol no alívio da dor pós-cesariana (BROWN *et al.*, 1992).

Com relação a tolerabilidade e aos efeitos adversos do tramadol, segundo FRICKE *et al.* (1991) aproximadamente 65% dos efeitos colaterais são representados por náuseas, vômitos, sonolência e tonturas. Este causa pouca repercussão cardio-circulatória, não exercendo efeitos depressores respiratórios significantes (FECHNER *et al.*, 1985, citado por TEIXEIRA *et al.*, 1999); efeitos disfóricos são raros, pelo menos após tratamentos de curta durações (OSIPOVA *et al.*, 1991, citado por TEIXEIRA *et al.*, 1999); pequena propensão em causar dependência física e psíquica e efeitos euforizantes (LENZHOFER & MOSER, 1984, citado por TEIXEIRA *et al.*, 1999; OSIPOVA *et al.*, 1991, citado por TEIXEIRA *et al.*, 1999).

WYNN (1996) relatou que o tramadol pode ser usado quando os AINES são contraindicados. No entanto, pode causar náusea, constipação e vômitos, não oferecendo vantagens sobre os narcóticos em termos de efeitos colaterais; em contrapartida, não é uma substância controlada nem aditiva.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais:

Foram utilizados 83 ratos machos Wistar, com 2-3 meses, pesando em média 250 gramas, provenientes do CEMIB-UNICAMP. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas com 5 animais, no máximo, em cada gaiola, em sala climatizada (20-24°C), e com ciclo claro/escuro de 12/12h (luzes acendendo as 6:00h) com alimentação e água *ad libitum*.

3.2 Teste Comportamental:

As sessões de teste foram realizadas entre 8:00 e 12:00 h em sala silenciosa, com temperatura ambiente mantida a 25°C (ROSLAND, 1991). Durante o teste os ratos não tiveram acesso à água ou à comida. Para minimizar o estresse durante as sessões experimentais os animais foram manipulados por um período de 7 dias antes dos procedimentos experimentais, pelo próprio pesquisador.

A experimentação animal seguiu as diretrizes propostas pelo comitê para Pesquisa e Ética da Associação Internacional para o estudo da dor (ZIMMERMANN, 1983) em animais conscientes. Essa pesquisa foi aprovada pela

Comissão de Ética na Experimentação Animal, Instituto de Biologia – UNICAMP (anexo).

Para a realização das análises comportamentais foi utilizada uma câmara de observação com base e 3 laterais espelhadas e frente de vidro medindo 30/30/30cm. Cada animal foi inicialmente colocado e mantido na câmara por 10 minutos para habituar-se ao ambiente de experimentação e minimizar o estresse.

Após esse período, o animal foi removido da câmara e anestesiado por inalação de Halotano. Para administração de OM na região da ATM direita foi utilizada uma agulha de calibre 30 conectada a uma seringa Hamilton (50 μ L) por um tubo de polietileno P₅₀. A borda póstero-inferior do arco zigomático foi palpada e a agulha inserida na porção inferior da mesma, sendo avançada em direção anterior até contactar a região póstero-lateral do côndilo.

Após a injeção periarticular o animal foi recolocado na câmara de observação e as respostas comportamentais nociceptivas caracterizadas pelo ato de coçar a região orofacial (CO), pelo ato de levantar rapidamente a cabeça (LC) foram quantificados utilizando-se respectivamente um cronômetro e um contador de células. O período de observação foi de 45 minutos, divididos em 15 blocos de 3 minutos. O comportamento de CO foi quantificado em segundos e o comportamento de LC em número de vezes que ocorria ao longo do experimento. Já o comportamento de tombar a cabeça para o lado da injeção foi quantificado pela incidência em que ocorria em porcentagem. Os comportamentos nociceptivos

induzidos pela administração de OM na região da ATM de ratos foram avaliados separadamente e conjuntamente pela soma do período de tempo que os animais apresentaram o comportamento de coçar com o número de vezes que os animais apresentaram o comportamento de levantar a cabeça (LC) ao longo do período de observação. Para a soma dos comportamentos determinou-se que cada comportamento de LC correspondeu a 1 segundo.

Após terminado o período de observação, o sítio de aplicação do OM foi confirmado *pós-mortem* através do indicador de edema, caracterizado pelo extravasamento plasmático (EP) do corante Azul de Evans (1%), administrado endovenosamente (0,4ml), estando os animais sob anestesia com cloridrato de xilazina 2% (0,05 mg/kg) e de ketamina (100 mg/kg) via intramuscular; decorridos 10 minutos o animal foi sacrificado e perfundido com salina. Como o corante Azul de Evans se liga às proteínas plasmáticas (HASS, et al., 1992), o local da injeção foi identificado visualmente, de acordo com a aparência do corante extravasado.

3.3 Soluções e Doses empregadas:

- Óleo de Mostarda (alil isotiocinato) a 1,5%, 2,5% e 4,5% , (Fonte: Sigma ®) .
- Azul de Evans (Sigma Chemical Co; St Louis, M.O.. USA) dissolvido em NaCl a 0.9%, preparado numa concentração de 1%. Sigma ®
- Halotano – Cristália ®

- Ketamina (100 mg/kg) - (dopalen[®]) – Agribands
- Xilazina 2% (0,05 mg/kg) - (Rompun[®]) – Bayer
- Qx 314-2% (quaternário hidrofílico derivado da lidocaína) – Sigma[®]
- Sulfato de Morfina (4mg/kg – 10 ml/kg) – Cristália[®]
- Dipirona (Novalgina[®]) - (19, 57, 95mg/kg) – Hoescht
- Cloridrato de Tramadol (Tramadol[®]) - (5, 7,5, 10mg/kg) - Searle
- Solução Salina 0.9%

3.4 Grupos Experimentais:

Os animais foram divididos em diferentes grupos experimentais. Os animais receberam uma injeção na região da ATM direita (50 μ L) de OM a 1,5% (grupo I - n = 6); OM a 2,5% (grupo II - n = 6); OM a 4,5% (grupo III - n = 6); óleo mineral (controle - grupo IV - n = 6).

Numa segunda etapa, após determinar 2,5% como menor concentração de OM capaz de aumentar de maneira significativa os comportamentos nociceptivos em relação ao grupo controle, foram realizados estudos complementares.

Com o intuito de confirmar o caráter nociceptivo das respostas comportamentais induzidas pela administração de OM na região da ATM de ratos, foram realizados dois grupos experimentais adicionais, nos quais o QX-314 2 % (25 μ L) foi co-administrado com a OM 5 % (25 μ L) na região da ATM (GRUPO V, n=6) e a morfina foi administrada intraperitonealmente (i.p) 30 minutos antes da administração de OM 2,5 % (50 μ L) na região da ATM (GRUPO VI, n=6).

Com a finalidade de se verificar a sensibilidade desse modelo comportamental de dor frente a 2 tipos de analgésicos foram realizados outros seis grupos, onde foi administrado via i.p., 30 minutos antes da administração do OM na concentração de 2,5%: dipirona 19mg/kg (grupo VII - n = 6), 57mg/kg (grupo VIII - n = 6), 95mg/kg (grupo IX - n = 6); Tramadol 5mg/kg (grupo X - n = 6), 7,5mg/kg (grupo XI - n = 6), 10mg/kg (grupo XII - n = 6); controle – salina + OM 2,5% (grupo XIII – n = 6) e salina + OM 5% (grupo XIV).

Após a aplicação dos diferentes tratamentos farmacológicos o comportamento dos animais foi observado por um período total de 45 minutos, como anteriormente descrito.

3.5 Análise Estatística:

Os dados com homogeneidade de variância foram analisados usando teste One-Way análise de variância (ANOVA) ou teste t. Comparações múltiplas foram realizadas aplicando-se o teste TUKEY. Dados sem homogeneidade de

variância foram analisados aplicando-se o teste One Way Analysis on Ranks KRUSKAL-WALLIS. Comparações múltiplas foram realizadas aplicando-se o teste DUNN. Para todos os testes o nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$. Os dados estão apresentados pela Média $\pm$ o Erro Padrão da Média. O programa utilizado para a realização dos cálculos estatísticos foi o SIGMA STAT.

4 RESULTADOS

1. *Efeito da administração de diferentes concentrações de óleo de mostarda sobre o comportamento de coçar a região orofacial:*

A administração de óleo de mostarda (50 µL) em diferentes concentrações (1,5; 2,5 ou 4,5 %) na região da ATM de ratos promoveu um aumento significativo ($p < 0,05$) no comportamento de coçar a região orofacial em relação à administração de óleo mineral (50 µL) a partir da concentração de 2,5% (TAB. 1, GRÁF. 1).

2. *Efeito da administração de diferentes concentrações de óleo de mostarda sobre o comportamento de levantar rapidamente a cabeça:*

A administração de óleo de mostarda (50 µL) em diferentes concentrações (1,5; 2,5 ou 4,5 %) na ATM de ratos promoveu um aumento significativo ($p < 0,05$) no comportamento de levantar rapidamente a cabeça em relação à administração de óleo mineral (50 µL) a partir da concentração de 2,5% (TAB. 1, GRÁF. 1).

TABELA 1. Valores médios correspondentes ao período de tempo que os animais apresentaram os comportamentos de coçar a região orofacial (CO) e levantar rapidamente a cabeça (LC) ao longo dos 45 minutos de observação.

GRUPOS (n=6)	LC (nº de vezes)	CO (segundos)
Óleo mineral	1,667±0,333	4,685 ± 0,768
OM 1,5%	27,333 ± 1,801	94,063 ± 10,17
OM 2,5%	62,5 ± 1,979 *	183,097 ± 7,705 *
OM 4,5%	77,667 ± 6,697 *	181,78 ± 28,232 *

*p<0,05, teste Dunn, indica diferença significativa em relação ao grupo controle (óleo mineral). Os dados estão expressos como média±EP.

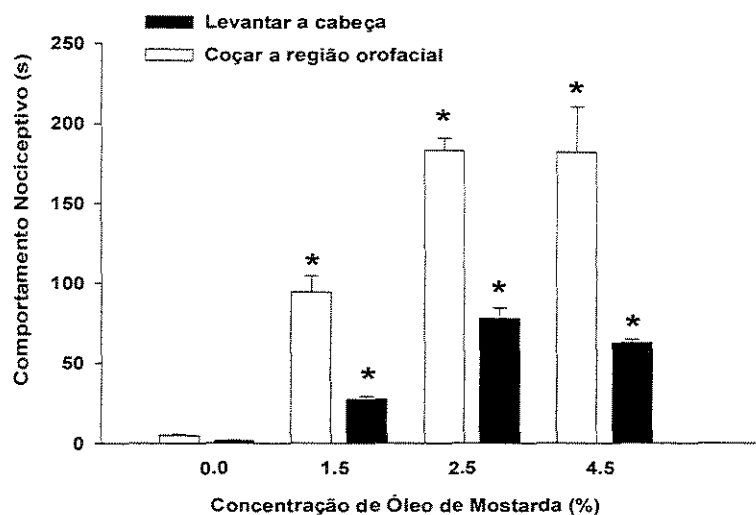


GRÁFICO 1. Efeito da administração de diferentes concentrações de óleo de mostarda na região da ATM de ratos sobre o comportamento de coçar a região orofacial e levantar rapidamente a cabeça ao longo dos 45 minutos de observação. Cada coluna representa a média±EP. *p<0,05, teste Dunn, indica um aumento significativo em relação ao óleo mineral (Controle).

3. Incidência da resposta comportamental caracterizada pelo ato de tombar a cabeça para o lado submetido à administração de óleo de mostarda na região da ATM de ratos:

Nenhum animal submetido à administração de óleo mineral (50 µL) na região da ATM apresentou o comportamento de tombar a cabeça para o lado injetado. Por outro lado, 100% dos animais submetidos à administração de óleo de mostarda nas concentrações de 1,5, 2,5 e 4,5 % apresentaram tal comportamento (TAB. 2).

TABELA 2. Incidência da resposta comportamental caracterizada pelo ato de tombar a cabeça para o lado submetido à administração de diferentes concentrações de óleo de mostarda região da ATM de ratos. Valores entre parênteses () indicam o número de ratos em cada grupo.

GRUPOS	INCIDÊNCIA
Óleo mineral (n=06)	0 %
óleo de mostarda 1,5 % (n=06)	100 %
óleo de mostarda 2,5 % (n=06)	100 %
óleo de mostarda 4,5 % (n=06)	100 %

4. Avaliação das respostas comportamentais induzidas pela administração de óleo de mostarda na região da ATM de ratos através da Soma das mesmas:

Os animais que foram submetidos à administração de óleo de mostarda na região da ATM apresentaram o comportamento de coçar a região orofacial e levantar rapidamente a cabeça de forma alternada, ou seja, ora coçavam, ora levantavam a cabeça. Este fato pode indicar uma complementação entre estes dois comportamentos. Com isso, os mesmos foram avaliados através da soma do período de tempo (segundos) que cada animal permaneceu coçando a região orofacial com o número total de vezes que cada animal levantou rapidamente a cabeça durante o período total de 45 minutos de observação.

A administração de diferentes concentrações de óleo de mostarda (1,5; 2,5 ou 4,5 %, 50 µL) na região da ATM de ratos promoveu um aumento significativo ($p < 0,05$, Teste Dunn) na resposta comportamental avaliada pela soma dos comportamentos de coçar a região orofacial e levantar rapidamente a cabeça em relação à administração de óleo mineral (50 µL) a partir da concentração de 2,5 %. (TAB. 3, GRÁF. 2).

TABELA 3. Valores médios correspondentes à soma dos comportamentos de coçar a região orofacial (CO) e levantar rapidamente a cabeça (LC) ao longo dos 45 minutos de observação.

GRUPOS (n=6)	Soma dos comportamentos (segundos)
Óleo mineral	6,368 ± 1,066
OM 1,5%	121,397 ± 10,643
OM 2,5%	245,597 ± 8,517 *
OM 4,5%	259,447 ± 33,959 *

* $p < 0,05$, teste Dunn, indica diferença significativa em relação ao óleo mineral. Os dados estão expressos em média ± EP.

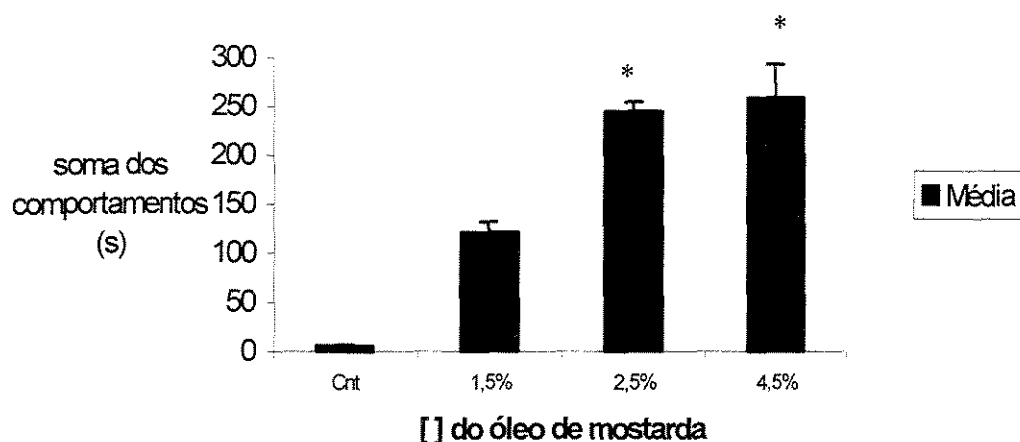


GRÁFICO 2. Efeito da administração de diferentes concentrações de óleo de mostarda na região da ATM de ratos sobre a resposta comportamental avaliada através da soma dos comportamentos caracterizados pelos atos de coçar a região orofacial e levantar rapidamente a cabeça. * $p < 0,05$, teste Dunn, indica um aumento significativo em relação ao óleo mineral. Cada coluna representa média ± EP.

5. Efeito da co-administração de QX-314 a 2 % e óleo de mostarda a 5 % na região da ATM de ratos e da administração intraperitoneal de morfina 30 minutos antes da administração periarticular de óleo de mostarda 2,5 %

sobre os comportamentos caracterizados pelo ato de coçar a região orofacial e levantar rapidamente a cabeça avaliados separadamente:

A co-administração de QX-314 a 2 % (25µL) e óleo de mostarda 5 % (25 µL) na região da ATM de ratos promoveu uma diminuição significativa ($p < 0,05$, Teste t) nas respostas comportamentais caracterizadas pelo ato de coçar a região orofacial e pelo ato de levantar rapidamente a cabeça em relação ao grupo controle (OM 5% + salina). (TAB. 4, GRÁF. 3)

A administração intraperitoneal de morfina 4mg/kg (10ml/kg) e de óleo de mostarda 2,5 % (50µL) na região da ATM de ratos promoveu uma diminuição significativa ($p < 0,05$, Teste t) na resposta comportamental caracterizada pelo ato de coçar a região orofacial e na resposta comportamental caracterizada pelo ato de levantar rapidamente a cabeça em relação ao grupo controle (OM 2,5% + salina). (TAB. 5, GRÁF. 4).

TABELA 4. Valores médios da co-administração do QX-314 a 2 % e óleo de mostarda 5 % na região da ATM de ratos sobre a resposta comportamental caracterizada pelo ato de coçar a região orofacial e levantar rapidamente a cabeça.

GRUPOS (n=6)	LC (nº de vezes)	CO (segundos)
Controle	49,667 ± 1,978	239,432 ± 5,828
Qx 314-2%	13,167 ± 1,195 *	126,123 ± 3,368 *

- $p < 0,05$, Teste t, indica diferença significativa em relação ao OM 5% + Salina (controle). Os dados estão expressos como média ± EP.

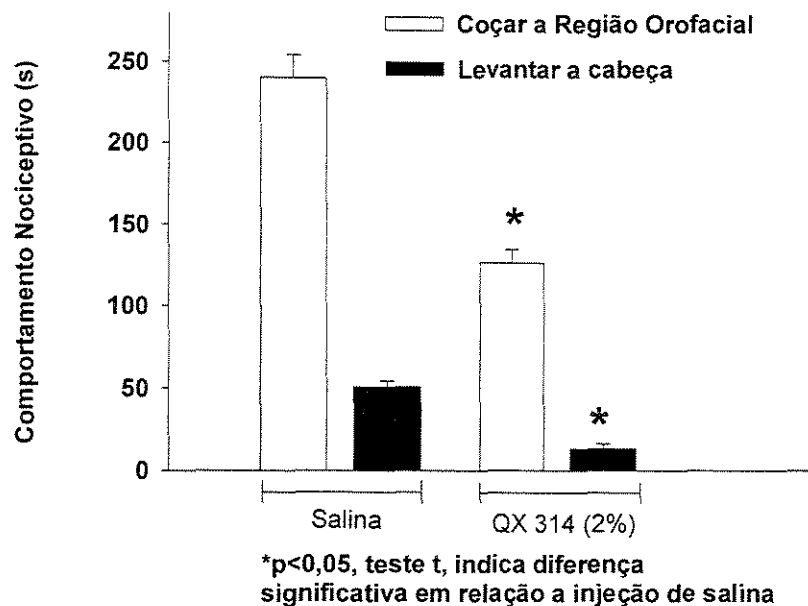


GRÁFICO 3. Efeito da co-administração do QX-314 a 2 % e óleo de mostarda 5 % na região da ATM de ratos sobre a resposta comportamental caracterizada pelo ato de coçar a região orofacial e levantar rapidamente a cabeça. Cada coluna representa a média $\pm$ EPM. *p<0,05, Teste t, indica uma diminuição significativa em relação ao OM 5% + Salina (controle).

TABELA 5. Valores médios da administração de morfina 30 minutos antes da administração de óleo de mostarda 2,5 % na região da ATM de ratos sobre a resposta comportamental caracterizada pelo ato de coçar a região orofacial e pelo ato de levantar rapidamente a cabeça.

GRUPOS (n=6)	LC (nº de vezes)	CO (segundos)
Controle	60,333 $\pm$ 1,667	314,935 $\pm$ 6,180
Sulfato de morfina	3,400 $\pm$ 0,510 *	68,318 $\pm$ 5,276 *

* p<0,05, Teste t, indica diferença significativa em relação ao óleo de mostarda 2,5% + salina (controle). Os dados estão expressos como média $\pm$ EP.

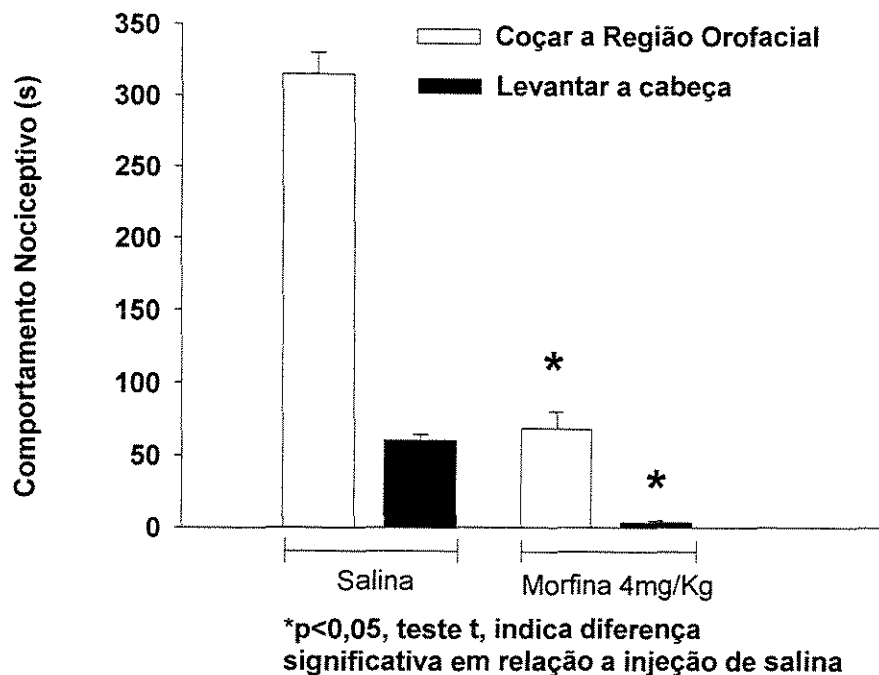


GRÁFICO 4. Efeito da administração de morfina 30 minutos antes da administração de óleo de mostarda 2,5 % na região da ATM de ratos sobre a resposta comportamental caracterizada pelo ato de coçar a região orofacial e pelo ato de levantar rapidamente a cabeça. Cada coluna representa a média $\pm$ EP. *p<0,05, Teste t, indica uma diminuição significativa em relação ao óleo de mostarda 2,5% + salina (controle).

6. Efeito da administração intraperitoneal de diferentes concentrações de dipirona (19, 57 e 95 mg/kg) 30 minutos antes da administração periarticular de óleo de mostarda 2,5 % na região da ATM de ratos sobre os comportamentos caracterizados pelo ato de coçar a região orofacial e levantar rapidamente a cabeça avaliados separadamente:

A pré-administração intraperitoneal de diferentes concentrações de dipirona (19, 57 e 95 mg/kg) e de óleo de mostarda 2,5 % (50µL) na região da ATM de ratos promoveu uma diminuição significativa ($p<0,05$, Teste tukey) na resposta comportamental caracterizada pelo ato de coçar a região orofacial e na resposta comportamental caracterizada pelo ato de levantar rapidamente a cabeça em relação ao grupo controle (OM 2,5% + salina). (TAB. 6, GRÁF. 5).

TABELA 6. Valores médios da administração de diferentes concentrações de dipirona (19, 57 e 95 mg/kg) 30 minutos antes da administração de óleo de mostarda 2,5 % na região da ATM de ratos sobre a resposta comportamental caracterizada pelo ato de coçar a região orofacial e pelo ato de levantar rapidamente a cabeça.

GRUPOS (n=6)	LC (nº de vezes)	CO (segundos)
Controle	60,333 ± 1,667	314,935 ± 6,180
Dipirona 19 mg/kg	46,333 ± 1,333 *	231,057 ± 6,426 *
Dipirona 57 mg/kg	34,667 ± 2,216 *	88,702 ± 4,951 *
Dipirona 95 mg/kg	13,333 ± 1,116 *	15,923 ± 1,641 *

* $p<0,05$, Teste tukey, indica diferença significativa em relação ao grupo controle (OM 2,5% + SALINA). Os dados estão expressos como média±EP.

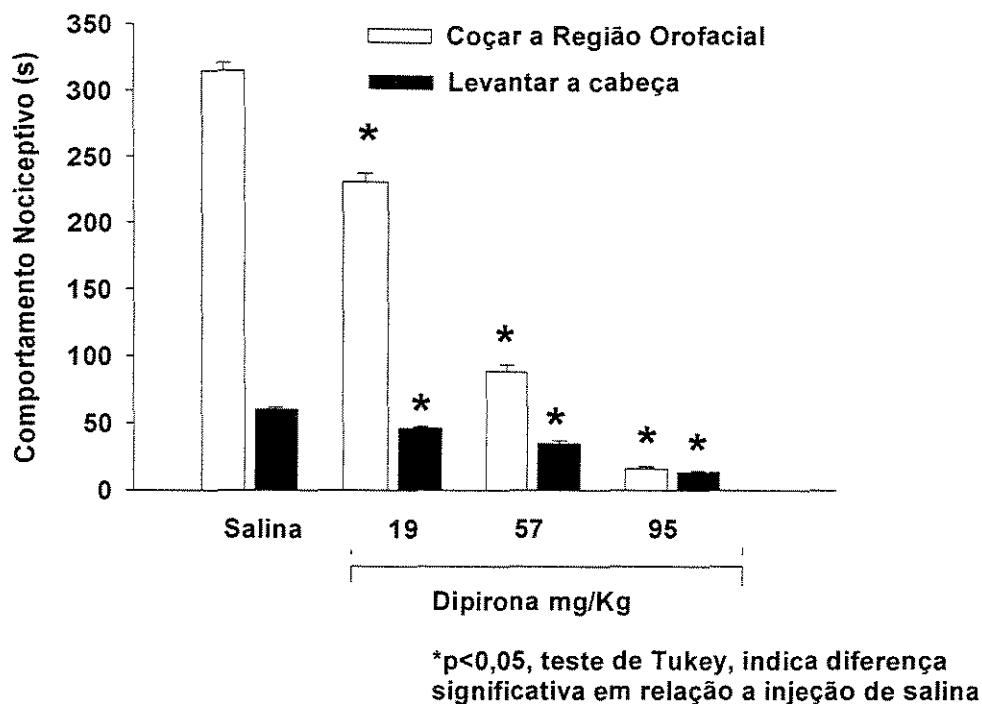


GRÁFICO 5. Efeito da administração de diferentes concentrações de dipirona (19, 57 e 95 mg/kg 30 minutos antes da administração de óleo de mostarda 2,5 % na região da ATM de ratos sobre a resposta comportamental caracterizada pelo ato de coçar a região orofacial e pelo ato de levantar rapidamente a cabeça. Cada coluna representa a média $\pm$ EP. *p<0,05, Teste tukey, indica uma diminuição significativa em relação ao óleo de mostarda 2,5% + salina (controle).

7. Efeito da administração de diferentes concentrações de dipirona (19, 57 e 95 mg/kg) 30 minutos antes da administração de óleo de mostarda 2,5 % na região da ATM de ratos sobre a soma dos os comportamentos caracterizados pelo ato de coçar a região orofacial e levantar rapidamente a cabeça.

A administração intraperitoneal de diferentes concentrações de dipirona (19, 57 e 95 mg/kg 30 minutos antes da administração de óleo de mostarda 2,5 % na região da ATM de ratos promoveu uma diminuição significativa (p<0,05, Teste

tukey) na resposta comportamental caracterizada pela soma dos comportamentos caracterizados pelo ato de coçar a região orofacial e levantar rapidamente a cabeça (TAB. 7, GRÁF. 6).

TABELA 7. Valores médios da administração de diferentes concentrações de dipirona (19, 57 e 95 mg/kg 30 minutos antes da administração de óleo de mostarda 2,5 % na região da ATM de ratos sobre a resposta comportamental caracterizada pela soma do comportamento de coçar a região orofacial e levantar rapidamente a cabeça.

GRUPOS (n=6)	Soma dos comportamentos (segundos)
Controle	375,268 ± 6,955
Dipirona 19 mg/kg	277,390 ± 7,390 *
Dipirona 57 mg/kg	123,368 ± 4,384 *
Dipirona 95 mg/kg	29,257 ± 2,051 *

*p<0,05, Teste tukey, indica diferença significativa em relação ao grupo controle (OM 2,5% + SALINA). Os dados expressos estão como média±EP.

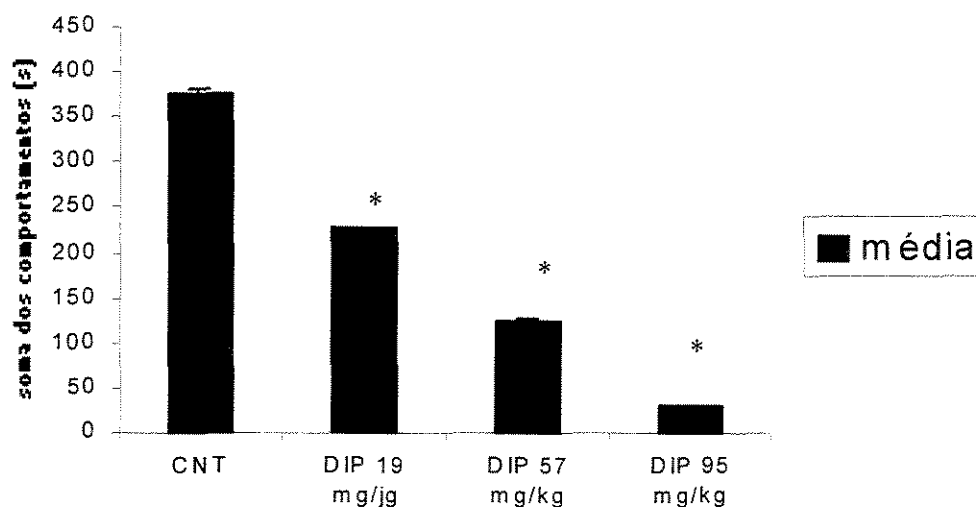


GRÁFICO 6. Efeito da administração de diferentes concentrações de dipirona (19, 57 e 95 mg/kg), 30 minutos antes da administração de óleo de mostarda 2,5 % na região da ATM de ratos sobre a resposta comportamental caracterizada pela soma do comportamento de coçar a região orofacial e levantar rapidamente a cabeça. Cada coluna representa média±EP. * p<0,05, Teste tukey, indica uma diminuição significativa em relação ao grupo controle (OM 2,5% + salina).

8. Efeito da administração intraperitoneal de diferentes concentrações de tramadol (5, 7,5 e 10 mg/kg) 30 minutos antes da administração periarticular de óleo de mostarda 2,5 % na região da ATM de ratos sobre os comportamentos caracterizados pelo ato de coçar a região orofacial e levantar rapidamente a cabeça avaliados separadamente:

A pré-administração intraperitoneal de diferentes concentrações de tramadol (5, 7,5 e 10 mg/kg) e de óleo de mostarda 2,5 % (50µL) na região da ATM de ratos promoveu uma diminuição significativa ($p < 0,05$, Teste tukey) na resposta comportamental caracterizada pelo ato de coçar a região orofacial e na resposta comportamental caracterizada pelo ato de levantar rapidamente a cabeça em relação ao grupo controle (OM 2,5% + salina). (TAB. 8, GRÁF. 8).

TABELA 8. Valores médios da administração de diferentes concentrações de tramadol (5, 7,5 e 10 mg/kg) 30 minutos antes da administração de óleo de mostarda 2,5 % na região da ATM de ratos sobre a resposta comportamental caracterizada pelo ato de coçar a região orofacial e pelo ato de levantar rapidamente a cabeça.

GRUPOS (n=6)	LC (nº de vezes)	CO (segundos)
Controle	60,333 ± 1,667	314,935 ± 6,180
Tramadol 5 mg/kg	25,833 ± 1,138 *	117,765 ± 3,528 *
Tramadol 7,5 mg/kg	10,333 ± 0,760 *	52,095 ± 3,987 *
Tramadol 10 mg/kg	5,333 ± 1,022 *	27,980 ± 2,940 *

* $p < 0,05$, Teste tukey, indica diferença significativa em relação ao grupo controle (OM 2,5% + SALINA). Os dados estão expressos como média±EP.

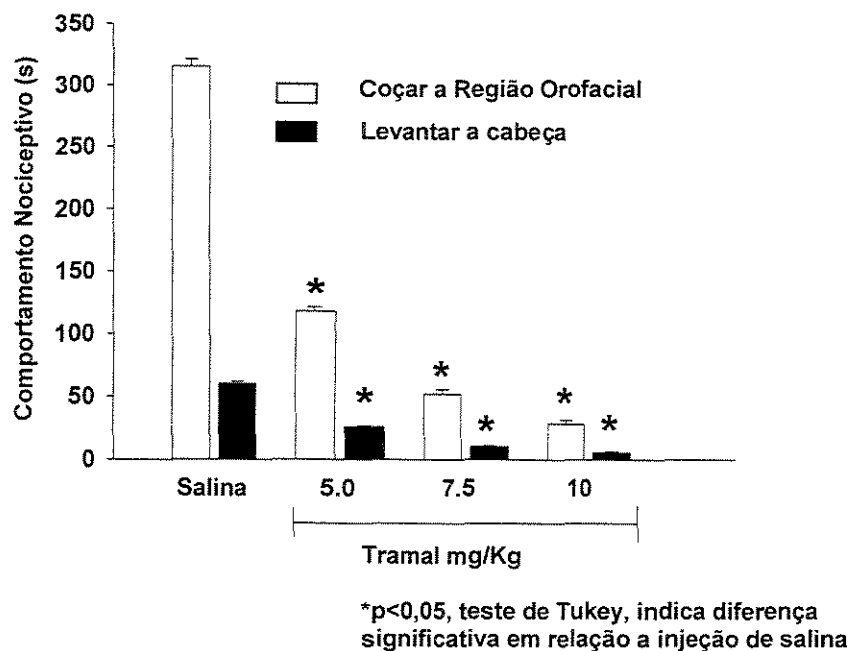


GRÁFICO 7. Efeito da administração de diferentes concentrações de tramadol (5, 7,5 e 10 mg/kg) 30 minutos antes da administração de óleo de mostarda 2,5 % na região da ATM de ratos sobre a resposta comportamental caracterizada pelo ato de coçar a região orofacial e pelo ato de levantar rapidamente a cabeça. Cada coluna representa a média $\pm$ EP. *p<0,05, Teste tukey, indica uma diminuição significativa em relação ao óleo de mostarda 2,5% + salina (controle).

9. Efeito da administração de diferentes concentrações de tramadol (5, 7,5 e 10 mg/kg) 30 minutos antes da administração de óleo de mostarda 2,5 % na região da ATM de ratos sobre a soma dos os comportamentos caracterizados pelo ato de coçar a região orofacial e levantar rapidamente a cabeça.

A administração intraperitoneal de diferentes concentrações de tramadol (5, 7,5 e 10 mg/kg) 30 minutos antes da administração de óleo de mostarda 2,5 % na região da ATM de ratos promoveu uma diminuição significativa ($p < 0,05$, Teste tukey) na resposta comportamental caracterizada pela soma dos comportamentos caracterizados pelo ato de coçar a região orofacial e levantar rapidamente a cabeça (TAB. 9, GRÁF. 8).

TABELA 9. Valores médios da administração de diferentes concentrações de tramadol (5, 7,5 e 10 mg/kg) 30 minutos antes da administração de óleo de mostarda 2,5 % na região da ATM de ratos sobre a resposta comportamental caracterizada pela soma do comportamento de coçar a região orofacial e levantar rapidamente a cabeça.

GRUPOS (n=6)	Soma dos comportamentos (segundos)
Controle	375,268 $\pm$ 6,955
Tramadol 5 mg/kg	143,598 $\pm$ 4,418 *
Tramadol 7,5 mg/kg	62,428 $\pm$ 3,700 *
Tramadol 10 mg/kg	33,313 $\pm$ 3,589 *

* $p < 0,05$, Teste tukey, indica diferença significativa em relação ao grupo controle (OM 2,5% + SALINA). Os dados estão expressos como média $\pm$ EP.

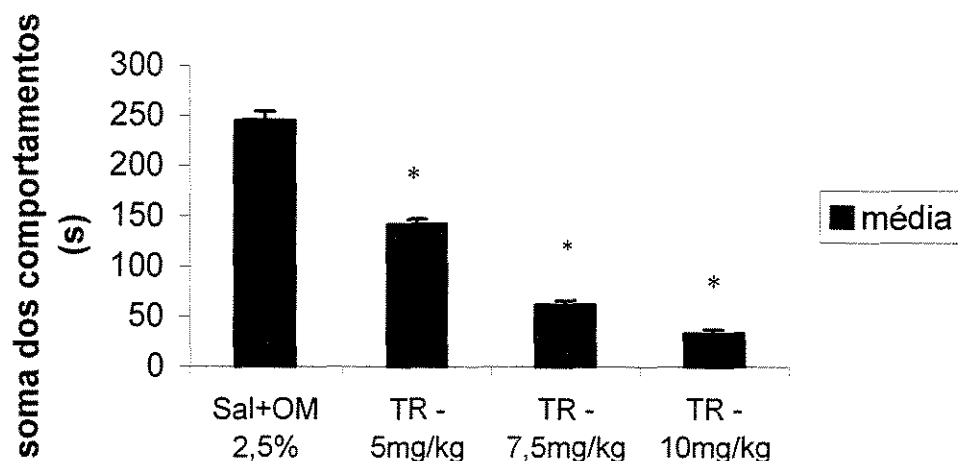


GRÁFICO . Efeito da administração de diferentes concentrações de tramadol (5, 7,5 e 10 mg/kg) 30 minutos antes da administração de óleo de mostarda 2,5 % na região da ATM de ratos na região da ATM de ratos sobre a resposta comportamental caracterizada pela soma do comportamento de coçar a região orofacial e levantar rapidamente a cabeça. Cada coluna representa a média $\pm$ EP. * $p < 0,05$, Teste tukey, indica uma diminuição significativa em relação ao grupo controle (M 2,5% + salina).

10. Porcentagem de redução do número de comportamentos nociceptivos somados pela pré-administração de tramadol e dipirona.

TABELA 10. Porcentagem de redução do número de comportamentos nociceptivos pela pré-administração de tramadol e dipirona.

GRUPOS (n=6)	Porcentagem de redução (%)
Tramadol 5 mg/kg	61,8
Tramadol 7,5 mg/kg	83,46
Tramadol 10 mg/kg	91,2
Dipirona 19mg/kg	26,2
Dipirona 57mg/kg	67,2
Dipirona 95mg/kg	92,2

5 Discussão

Para estudo dos mecanismos dolorosos, têm sido desenvolvidos modelos experimentais usando animais de laboratório, e para isso, vários agentes irritantes têm sido utilizados, com a finalidade de induzir processos dolorosos similares àqueles normalmente encontrados nas condições de dor clínica que acometem os seres humanos (REN & DUBNER, 1999b).

O presente estudo mostrou que a administração de OM mas não de óleo mineral na região da ATM de ratos, produz respostas comportamentais nociceptivas quantificáveis e estereotipadas, caracterizadas pelo ato do animal levantar rapidamente a cabeça, coçar a região orofacial e tombar a cabeça do lado injetado, características estas semelhantes às obtidas por ROVERONI *et al.* (2001), que injetou formalina na região da ATM de ratos, e também quantificou as respostas nociceptivas por 45 minutos. Outros estudos, no entanto, em modelos de atividade eletromiográfica em que foi injetado OM 20% na ATM de ratos anestesiados, também mostraram a ineficiência do óleo mineral em induzir mudanças eletromiográficas significantes (HU *et al.*, 1994; YU *et al.*, 1994; YU *et al.*, 1995; YU *et al.*, 1996).

O comportamento de tombar a cabeça para o lado direito, local da injeção de OM, não foi observado no grupo controle (óleo mineral). O comportamento de tombar a cabeça para o lado injetado embora de difícil quantificação, mostra similaridades com o que ocorre nas condições de dor clínica na região orofacial, como por exemplo a dor dental. Embora tenha sido observado em todos os

animais submetidos a administração de diferentes concentrações de óleo de mostarda na região da ATM, a avaliação do comportamento de tombar a cabeça é extremamente difícil, uma vez que, o momento exato a partir do qual o animal apresenta esse comportamento é muito variável e subjetivo, considerando que o animal tomba a cabeça progressivamente ao longo do experimento. Diante disso, o comportamento de tombar a cabeça foi avaliado pela incidência em que ocorria e pôde-se observar que todos os animais submetidos a administração de óleo de mostarda na região da ATM apresentaram este comportamento (TAB. 2)

Outro comportamento considerado nociceptivo, o de levantar rapidamente a cabeça, semelhante ao obtido por ROVERONI *et al.* (2001) foi exacerbado de maneira significativa pela administração de óleo de mostarda em relação ao grupo em que foi injetado óleo mineral (TAB. 1, GRÁF. 1). O comportamento de dor caracterizado pela elevação rápida e intermitente da pata submetida à injeção subcutânea de formalina assemelha-se muito ao comportamento caracterizado pelo ato de levantar rapidamente a cabeça induzido pela administração de óleo de mostarda na ATM. Dessa forma então podemos fazer uma analogia a retirada da pata tratada que ocorre quando da administração de formalina (WHEELER-ACETO & COWAN, 1993).

Dentre a multiplicidade das funções do comportamento de coçar, seu papel como resposta dolorosa é de importância particular à pesquisa experimental da dor. Os padrões de coçar provocados por irritação localizada ou por estimulação nociva têm uma organização diferente daquela relacionada à manutenção da pelagem, termorregulação ou sinalização social. O comportamento de coçar dos

roedores, que não está relacionado à resposta dolorosa, consiste de episódios prolongados de cuidado e atenção com a pelagem altamente organizados. Nesse caso, o ato de coçar é realizado no sentido rostrocaudal, iniciando-se na região facial com seqüências de coçar a face estereotipadas e simétricas ao transitar de uma região do corpo para outra (VOS *et al.*, 1998). A administração de diferentes concentrações de óleo de mostarda na região da ATM de ratos promoveu um aumento significativo no comportamento de coçar a região orofacial em relação a administração de óleo mineral (TAB. 1, GRÁF. 1). Todos os animais tiveram o comportamento de coçar exacerbado em decorrência da administração de óleo de mostarda na região da ATM e, coçaram a região orofacial de forma assimétrica com a pata dianteira ipsilateral e, eventualmente, com a pata traseira, apesar do movimento de coçar a região orofacial com a pata dianteira ter sido freqüentemente acompanhado da pata contralateral. Embora o comportamento de coçar a região orofacial assemelhe-se ao comportamento relacionado com o cuidado com a pelagem, tem sido demonstrado que uma distribuição assimétrica e prolongada no ato de coçar a face não ocorre espontaneamente em ratos normais (VOS *et al.*, 1998) e que o ato de coçar a região orofacial com a pata dianteira ipsilateral freqüentemente é acompanhado por movimentos similares da pata contralateral, após a administração de formalina na região perioral (CLAVELOU *et al.*, 1989).

A literatura mostra que o OM vem sendo utilizado em estudos eletromiográficos na concentração de 20%, a qual produz um aumento da atividade eletromiográfica dos músculos masséter e digástrico de ratos

anestesiados (YU *et al.*, 1994; YU *et al.*, 1995). No entanto, óleo de mostarda, na concentração de 20% por provocar respostas dolorosas de grande intensidade como visto em estudos preliminares realizados em nosso laboratório, não deve ser considerado um modelo ideal para estudo comportamental. Os resultados obtidos no presente estudo, demonstraram que o OM em concentrações bem mais baixas, já é capaz de produzir respostas comportamentais quantificáveis de maneira dose-dependente, uma vez que existe diferença significativa nas respostas nociceptivas desencadeadas pelo OM à 1,5% e 4,5%. Entretanto não houve diferença significativa entre as concentrações de 2,5% e 4,5%, sendo considerada a concentração de 2,5% a de escolha, por propiciar uma maior margem de segurança nos nossos experimentos e ser a menor concentração que aumentou os comportamentos de CO e LC de maneira estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. MACMAHON & ABEL (1987) demonstraram a infiltração de neutrófilos polimorfonucleares 1 h após a instilação de OM 2,5% na bexiga de ratos.

Tem sido descrito na literatura que a simples soma de mais de um comportamento parece ser a forma mais adequada de avaliar as respostas comportamentais induzidas pela administração de formalina, uma vez que, pode haver uma interação entre os comportamentos (WHEELER-ACETO & COWAN, 1993; ABBOTT *et al.*, 1995).

Os animais que foram submetidos à aplicação de óleo de mostarda na ATM emitiram os comportamentos de coçar a região orofacial e de levantar rapidamente a cabeça de forma alternada, ora coçando, ora levantando a cabeça,

Diante disto, essas respostas foram avaliadas conjuntamente somando-se (ABBOTT *et al.*, 1995) o período de tempo que os animais emitiram o comportamento de coçar com o número de vezes que os animais emitiram o comportamento de levantar a cabeça ao longo do período de observação. Para isto, estabeleceu-se que cada movimento caracterizado pelo ato de levantar rapidamente a cabeça, equivalia a um segundo semelhante ao que foi feito por ROVERONI *et al.* (2001) .

O caráter nociceptivo das respostas comportamentais induzidas pela administração de OM 2,5% na região da ATM de ratos ficou comprovada em outros dois grupos experimentais. Um grupo recebeu um bloqueio anestésico induzido pela co-administração do quaternário hidrofílico derivado da lidocaína (QX-314 - 2%) e OM 5% (25µl) na região da ATM. Outro grupo recebeu a administração sistêmica (via intraperitoneal (i.p.) de uma droga analgésica clássica, o sulfato de morfina em uma dose que não produziu nenhum efeito no sistema locomotor (4mg/kg), 30 minutos antes da aplicação de OM 2,5% (50µL) na região da ATM. Os resultados demonstraram que o bloqueio anestésico produzido pela co-administração do quaternário hidrofílico derivado da lidocaína (QX-314 - 2%), com OM reduziu significativamente os comportamentos nociceptivos caracterizados por levantar rapidamente a cabeça e coçar a região orofacial (TAB. 4, GRÁF. 3). Esses dados são consistentes aos obtidos por YU *et al.* (1995), no qual a injeção de lidocaína 2% acompanhada por OM na região da ATM não produziu nenhum aumento significativo na atividade eletromiográfica.

Da mesma forma a pré-administração sistêmica (30 min.-i.p) de morfina (4mg/kg – 10ml/kg), reduziu de maneira significativa os comportamentos descritos acima (TAB. 5, GRÁF. 4), resultados estes semelhantes aos obtidos por HARTWIG *et al.* (1996), no qual a morfina (2.5, 5 ou 10mg/kg) reduziu de maneira dose-dependente os comportamentos nociceptivos induzidos pela administração de OM na ATM de ratos. Assim sendo, as respostas comportamentais obtidas nesse modelo experimental que são caracterizadas pela exacerbação dos comportamentos de coçar a região orofacial e levantar rapidamente a cabeça, podem ser utilizadas como índice de dor orofacial semelhante ao ocorrido no teste da formalina na ATM de ratos conforma descrito por ROVERONI *et al.* (2001).

Foi testado, após a padronização do modelo comportamental, duas diferentes classes de drogas analgésicas. O presente estudo demonstrou que a pré-administração sistêmica do cloridrato de tramadol, nas concentrações de 5, 7,5 e 10 mg/kg, reduziram de maneira dose-dependente o número de comportamentos nociceptivos caracterizados pelo ato de levantar rapidamente a cabeça e coçar a região orofacial (TAB. 8, GRÁF. 7) ou pela soma de ambos os comportamentos (TAB. 9, GRÁF. 8). Estudos sugerem que o aumento da atividade eletromiográfica evocada pela administração de OM na ATM, pode ser atribuída a uma resposta reflexa mediada centralmente (YU *et al.*, 1995).

Da mesma forma a pré-administração sistêmica de dipirona, nas concentrações de 19, 57 e 95 mg/kg reduziu de maneira dose-dependente o número de comportamentos nociceptivos caracterizados pelo ato de levantar rapidamente a cabeça e coçar a região orofacial (TAB. 6, GRÁF. 5) ou pela soma

dos mesmos (TAB. 7, GRÁF. 6). REN & DUBNER (1999b), em um estudo, mostra que a aplicação de OM produz um estado de hiperalgesia inflamatória com início após 5 minutos da aplicação e com duração inferior a 1 hora. O mecanismo de ação analgésica da dipirona que é o antagonismo da hiperalgesia inflamatória, deprimindo diretamente a atividade dos nociceptores (LORENZETI & FERREIRA, 1985), talvez explique sua efetividade nesse tipo de modelo comportamental em que foi injetado OM na ATM de ratos.

Comparando os efeitos do tramadol e da dipirona, ficou demonstrado que a redução do número de comportamentos nociceptivos foi maior com doses terapêuticas de tramadol do que de dipirona. Apenas numa dose muito excessiva a dipirona (95mg/kg), teve sua efetividade comparável à dose de tramadol equivalente (10mg/kg). Já na dose de 7,5mg/kg, o tramadol teve sua efetividade em reduzir o número de comportamentos nociceptivos comparável à redução obtida quando da administração de sulfato de morfina 4mg/kg (TAB. 10).

Com os resultados obtidos podemos verificar que mesmo sendo um agente algésico com mecanismo de ação diferente da formalina que causa injúria tecidual e a liberação no local de uma série de substâncias que estimulam as fibras aferentes nociceptivas primárias, o óleo de mostarda, um estimulante direto de fibras C, produziu respostas comportamentais nociceptivas semelhantes às obtidas no teste da formalina na ATM de ratos desenvolvido por ROVERONI *et al.* (2001), demonstrando que o modelo utilizado pode ser de grande valia para o estudo da dor proveniente dos tecidos craniomandibulares e também para o estudo do efeito de drogas analgésicas nesse tipo de nocicepção.

6 CONCLUSÕES

- O óleo de mostarda em baixas concentrações, quando administrado na região da ATM de ratos, é capaz de desencadear respostas comportamentais nociceptivas quantificáveis, sendo determinada a concentração de 2,5% como ideal.
- O caráter nociceptivo dessas respostas, foi comprovado pela co-administração e pela administração respectivamente de Qx 314 – 2% e sulfato de morfina, os quais reduziram o número de comportamentos nociceptivos caracterizados pelo ato de coçar a região orofacial e levantar rapidamente a cabeça.
- Esse tipo de modelo comportamental se mostrou sensível ao Tramadol (5, 7,5 e 10 mg/kg) e Dipirona (19,57 e 95 mg/kg), os quais reduziram de maneira dose-dependente o número de comportamentos nociceptivos citados acima.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- 1) ABBOTT, F.V.; FRANKLIN, K.B.J.; WESTBROOK, R.F. The formalin test: scoring properties of the first and second phases of the pain response in rats. **Pain**, Amsterdam, v.60, n.1, p.91-102, Jan. 1995.
- 2) AGHABEIGI, B. The pathophysiology of pain. **Br Dent J**, London, v.173, n.3, p.91-96, Aug. 1992.
- 3) AGUIRRE-BANUELOS, P.; GRANADOS-SOTO, V. Evidence for a peripheral mechanism of action for the potentiation of the antinociceptive effect of morphine by dipirone. **J Pharmacol Toxicol Methods**, New York, v.42, n.2, p.79-85, Oct. 1999.
- 4) ALDER, M.E. *et al.* Magnetic resonance spectroscopy of inflammation associated with the temporomandibular joint. **Oral Surg Oral med Oral Pathol**, Saint Louis, v.74, n.4, p.515-523, Oct. 1992.
- 5) BEREITER, D.F.; BEREITER, A.C. Morphine and NMDA receptor antagonism reduce c fos expression in spinal trigeminal nucleus produced by acute injury to the TMJ region. **Pain**, Amsterdam, v.85, n.1/2, p.65-77, 2000.
- 6) BROGDEN, R.N. Pyrazolone derivatives. **Drugs**, Auckland, v.32, p.60- 70, 1986.
- 7) BROWN, J. *et al.* Tramadol HCl: dose response in pain following cesarean section. **Clin Pharmacol Ther**, Saint Louis, v.51, p.121, 1992.

* Baseada na NBR-6023 de ago. de 2000, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).
Abreviatura dos títulos dos periódicos em conformidade com o MEDLINE.

- 8) CLARK, G.T.; RUGH, J.D.; HANDELMAN, S.L. Nocturnal masseter muscle activity and urinary catecholamine levels in bruxers. **J Dent Res**, Washington, v.59, p.1571-1576, 1980.
- 9) CLAVELOU, P. *et al.* Application of the formalin test to the study of orofacial pain in the rats. **Neurosci Lett**, Limerick, v.103, n.3, p.349-353, Sept. 1989.
- 10) CODERRE, T.J. *et al.* Contribution of central neuroplasticity to pathological pain: review of clinical and experimental evidence. **Pain**, Amsterdam, v.5, p.259-285, 1993.
- 11) COLLINS, M. *Et al.* The effect of tramadol on dento-alveolar surgical pain. **Br J Oral Maxillofac Surg.**, v. 35, p. 54-58, 1997.
- 12) COOPER, S.A. Treating acute pain: do's and don'ts, pros and cons. **J Endod**, Baltimore, v.16, n.2, p.85-91, Feb. 1990.
- 13) DAFTARY, S.N. *et al.* A controlled comparison of dipyron and paracetamol in post-episiotomy pain. **Curr Med Res Opin**, Hampshire, v.6, p.614-618, 1980.
- 14) DAYER, P.; COLLART, L.; DESMEULES, J. The pharmacology of tramadol. **Drugs**, Auckland, v.47, Supplement 1, p.3-7, 1994.
- 15) DENUCCI, D.J.; DIONNE, R.A.; DUBNER, R. Identifying a neurobiologic basis for drug therapy in TMD's. **J Am Dent Assoc**, Chicago, v.127, p.581-593, 1996.
- 16) DIONNE, R.A. Pharmacologic treatments for temporomandibular disorders. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, Saint Louis, v.83, p.134-142, 1997.

- 17) DONNERER , J. *et al.* Neurogenic and non-neurogenic inflammation in the rat paw following chemical sympathectomy. **Neuroscience**, Washington, v.45, p.761-765, 1991.
- 18) DRAY, A. Inflammatory mediators of pain. **Br J Anaesth**, London, v.75, p.125-131, 1995.
- 19) DUBNER, R. Pain control in dentistry: anatomic and physiologic basis of orofacial pain. **Pain**, Amsterdam, v.8, p.409-416, 1986.
- 20) DUBNER, R.; BENNET, G.J. Spinal and trigeminal mechanisms of nociception. **Annu Rev Neurosci**, Palo Alto, v.6, p.381-418, 1993.
- 21) DUBUISSON, D.; DENNIS, S.G. The formalin test: a quantitative study of analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain**, Amsterdam, v.4, p.161-174, 1977.
- 22) DWORKIN, S.F. *et al.* Epidemiology of signs and symptoms in TMJ: clinical signs in cases and controls. **J Am Dent Assoc**, Chicago, v.120, p.273-281, 1990.
- 23) EKBERG, E.C.; KOPP, S.; AKERMAN, S. Diclofenac sodium as na alternative treatment of TMJ. **Acta Odontol Scand**, Oslo, v.54, n.3, p.154-159, June 1996.
- 24) FECHNER, R.; RACENBERG, E.; CASTOR, G. Clinical investigations on the effect of morphine, pentazocine, pethidine, piritramide and tramadol on respiration. **Anesth Intensivmed**, v.26, p.126-132, 1985. *Apud* TEIXEIRA, M.J.; OKADA, M.; TEIXEIRA, W.G.J. *Op. cit.* Ref. 75.
- 25) FILLINGIM, R.B. *et al.* Generalized vibrotactile allodynia in a patient with temporomandibular disorder. **Pain**, Amsterdam, v.78, p.75-78, Apr., 1998.

- 26) FRICKE, J.R. Tramadol HCL: dose response in pain from oral surgery. **Clin Pharmacol Ther**, Saint Louis, v.49, p.182, 1991. Abstract.
- 27) GIBBINS, I.L.; WATTCHOW, D.; COVENTRY, B. Two immunohistochemically identified populations of calcitonin gene-related peptide (CGRP)-immunoreactive axons in human skin. **Brain Res**, Amsterdam, v.414, p.143-148, 1987.
- 28) GOMES-GIMENES, J. *et al.* Clinical efficacy of mild analgesics in pain following gynaecological or dental surgery. Report on multicentre studies. **Br J Clin Pharmacol**, Oxford, v.10, p.355s-358s, 1980.
- 29) HAAS, D.A *et al.* Development of na orofacial model of acute inflammation in the rat. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.37, p.417-422, 1992.
- 30) HARTWIG, A.C. *et al.*, Development and use of a behavioral model of TMJ pain in the rat. **Neuroscience**, Washington, v.22, n.712, p.1814, 1996, Abstract.
- 31) HATHAWAY, C.B.; HU, J.W.; BEREITER, D.A. Distribution of Fos-like immunoreactivity in the caudal brainstem of the rat following noxious chemical stimulation of the temporomandibular joint. **J Comp Neurol**, New York, v.356, n.3, p.444-456, June 1995.
- 32) HENNIES, H.H.; FRIFERICH, E.; SCHNEIDER, J. Receptor binding, analgesic and antitussive potency of tramadol and other selected opioids. **Arzneimittelforschung**, Aulendorf, v.38, n.7, p.877-880, July 1988.
- 33) HOLZER, P. Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: Involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. **Neuroscience**, Washington, v.24, p.739-768, 1988.

- 34) HU, J.W. *et al.* Deep Craniofacial Pain: Involvement of trigeminal subnucleus caudalis and modulation. *In: WORLD CONGRESS ON PAIN, PROGRESS IN PAIN RESEARCH AND MANAGEMENT*, 8., 1997, Seattle. **Proceedings...** Seattle: IASP, 1997. v.8, p.1-11.
- 35) HU, J.W. *et al.* Electromyographic and trigeminal brainstem neuronal changes associated with inflammatory irritation of superficial and deep craniofacial tissues in rats. *In: WORLD CONGRESS ON PAIN, PROGRESS IN PAIN RESEARCH AND MANAGEMENT*, 7., 1994, Seattle. **Proceedings...** Seattle: IASP, 1994. v.2, p.325-336.
- 36) HU, J.W. Response properties of nociceptive and non-nociceptive neurons in the rat's trigeminal subnucleus caudalis (medullary dorsal horn) related to cutaneous and deep craniofacial afferent stimulation and modulation by diffuse noxious inhibitory controls. **Pain**, Amsterdam, v.41, p.331-345, 1990.
- 37) HU, J.W.; DOSTROVSKY, J.O.; SESSLE, B.J. Functional properties of neurons in cat trigeminal subnucleus caudalis (medullary dorsal horn). I- Response to orofacial noxious and non noxious stimuli and projections to thalamus and subnucleus oralis. **J Neurophysiol**, Bethesda, v.45, p.173-192, 1981.
- 38) HUOPNIEMI, T. *et al.* Response characteristics of tooth pulp-driven postsynaptic neurons in the spinal trigeminal subnucleus oralis of the cat. **Acta Physiol Scand**, Oxford, v.144, n.2, p.177-183, Feb. 1992.
- 39) INOUE, H. *et al.* Mechanism of mustard oil-induced skin inflammation in mice. **Eur J Pharmacol**, Amsterdam, v.333, p.231-240, 1997.

- 40) IRVING, J.; WOOD, G.D.; HACKETT, A.F. Does TMJ pain dysfunction syndrome affect dietary intake? **Dent Update**, London, v.26, n.9, p.405-407, Nov. 1999.
- 41) ISHIKAWA, T. *et al.* Nerve growth factor inducer, 4-methyl catechol, potentiates central sensitization associated with acceleration of spinal glutamate release after mustard oil paw injection in rats. **Cell Mol Neurobiol**, New York, v.19, n.5, p.587-596, Oct. 1999.
- 42) JIANG, M.C.; GEBHART, G.F. Development of mustard oil hyperalgesia in rats. **Pain**, Amsterdam, v.77, p.305-313, 1998.
- 43) KAYSER, V. *et al.* Evidence for noradrenergic component in the antinociceptive effect of the analgesic agent tramadol in an animal model of clinical pain, the arthritic rat. **Eur J Pharmacol**, Amsterdam, v.224, p.83-88, 1992.
- 44) LAIRD, J.M.A.; ROZA, C.; OLIVAR, T. Antinociceptive activity of metamizol in rats with experimental ureteric calculosis: central and peripheral components. **Inflamm Res**, Basel, v.47, p.389-395, 1998.
- 45) LENZHOFER, R.; MOSER, K. Analgesic effect of tramadol in patients with malignant diseases. **Wien Med Wochenschr**, Wien, v.134, p.1-11, 1984. *Apud* TEIXEIRA, M.J.; OKADA, M.; TEIXEIRA, W.G.J. *Op. cit.* Ref. 75.
- 46) LORENZETTI, B.B.; FERREIRA, S.H. Mode of action of dipyrone: Direct antagonism of inflammatory hyperalgesia. **Eur J Pharmacol**, Amsterdam, v.114, p.375-381, June 1985.
- 47) MACMAHON, S.B.; ABEL, C. A model for the study of visceral pain states. **Pain**, Amsterdam, v.28, p.109-127, 1987.

- 48) MAIXNER, W. *et al.* Sensivity of patients with TMJ to experimentally evoked pain: evidence for altered temporal summation of pain **Pain**, Amsterdam, v.76, p.71-81, 1998.
- 49) MAZARIO, J.; HERRERO, J.F. Antinociceptive effects of metamizol (dipyrone). **Neurosci Lett**, Limerick, v.274, n.3, p.179-182, Oct. 1999.
- 50) MEHLISCH, C.H.; MINN, F.; BROWN, P. Tramadol hydrochloride: efficacy compared to codeine sulfate, acetaminophen with dextropropoxyphene and placebo in dental extraction pain. **Clin Pharmacol Ther**, Saint Louis, v.47, p.187, 1990.
- 51) MIAMPAMBA, M. *et al.* Inflammation of the colonic wall induced by formalin as a model of acute visceral pain. **Pain**, Amsterdam, v.57, p.327-334, 1993.
- 52) MOROZ, B.T.; IGNATOV, Y.D.; KALININ, V.I. Use of tramadol hydrochloride in therapeutic operative dentistry: clinical investigation. **Curr Ther Res Clin Exp**, Belle Mead, v.49, p.371-375, 1991.
- 53) MUKHERJEE, S.; SOOD, S. A controlled evaluation of orally administred aspirin, dipyrone and placebo in patients with post-operative pain. **Curr Med Res Opin**, Hampshire, v.6, p.619-623, 1980.
- 54) MUNRO, F.E. *et al.* The effects of neurokinin receptor antagonists on mustard oil-evoked activation of rat dorsal horn neurons. **Neuropeptides**, Edinburgh, v.25, p.299-305, 1993.
- 55) NEUGEBAUER, V. *et al.* Electrophysiological evidence for a spinal nociceptive action of dipyrone. **Agents Actions**, Basel, v.41, p.62-70, 1994.

- 56) OSIPOVA, N.A. *et al.* Analgesic effect of tramadol in cancer patients with chronic pain: a comparison with prolonged action morphine sulfate. **Curr Ther Res Clin Exp**, Belle Mead, v.50, p.812-821, 1991. *Apud* TEIXEIRA, M.J.; OKADA, M.; TEIXEIRA, W.G.J. *Op. cit.* Ref. 75.
- 57) PLANAS, M.E. *et al.* Pharmacodynamics: Oral metamizol (1g and 2g) versus ibuprofen and placebo in the treatment of lower third molar surgery pain: randomised double-blind multicentre study. **Eur J Clin Pharmacol**, Berlin, v.53, n.6, p.405-409, 1998.
- 58) RABOISSON, P *et al.* Effects of subcutaneous formalin on the activity of trigeminal brain stem nociceptive neurones in the rat. **J Neurophysiol**, Bethesda, v.73, p.496-505, 1995.
- 59) RAFFA, R.B. *et al.* Opioid and non-opioid components independently contribute to the mechanism of action of tramadol, an atypical opioid analgesic. **J Pharmacol Exp Ther**, Baltimore, v.260, n.1, p.275-285, Jan. 1992.
- 60) REN, K.; DUBNER, R. Central nervous system plasticity and persistent pain. **J Orofac Pain**, Carol Stream, v.13, n.3, p.155-163, 1999a.
- 61) REN, K.; DUBNER, R. Inflammatory models of pain and hyperalgesia. **ILAR J**, Washington, v.40, n.3, p.111-118, June 1999b.
- 62) RO, J.Y.; CAPRA, N.F. Evidence for subnucleus interpolaris in craniofacial muscle pain mechanisms demonstrated by intramuscular injections with hypertonic saline. **Brain Res**, Amsterdam, v.842, n.1, p.166-183, Sept. 1999.
- 63) ROSLAND, J.H. The formalin test in mice: the influence of ambient temperature. **Pain**, Amsterdam, v.45, p.211-216, 1991.

- 64) ROVERONI, R.C. *et al.* Development of a behavioral model of TMJ pain in rats: the TMJ formalin test. **Pain**, Amsterdam, v.94, n.2, p.185-191, Nov. 2001.
- 65) SESSLE, B.J. Brainstem mechanisms underlying craniofacial pain and its modulation. **Adv Pain Res Ther**, New York, v.22, p.413-421, 1995.
- 66) SESSLE, B.J. Mechanisms of trigeminal and occipital pain. **Pain Rev**, London, v.3, p.91-116, 1996.
- 67) SESSLE, B.J. Recent developments in pain research: central mechanisms of orofacial pain and its control. **J Endod**, Baltimore, v.12, n.10, p.435-444, Oct. 1986.
- 68) SESSLE, B.J. The neurobiology of facial and dental pain: present knowledge, future directions. **J Dent Res**, Washington, v.66, n.5, p.962-981, May 1987.
- 69) SESSLE, B.J.; HU, J.W. Mechanisms of pain arising from articular tissues. **Can J Physiol Pharmacol**, Ottawa, v.69, n.5, p.617-626, May 1991.
- 70) SOYGUDER, Z.; SCHIMDT, H.H.; MORRIS, R. Postnatal development of nitric oxide synthase type 1 expression in the lumbar cord of the rat: a comparison with the induction of c-fos in response to peripheral application of mustard oil. **Neurosci Lett**, Limerick, v.180, p.188-192, 1994.
- 71) SUNSHINE, A. New clinical experience with tramadol. **Drugs**, Auckland, v.47, Supplement 1, p.8-18, 1994.
- 72) SUNSHINE, A.; LASKA, E.; SLAFTA, J. A comparison of the analgesics effects of tramadol and propoxyphene HCL. Bulletin, Problems of Drug Dependence, National Academy of Sciences, National Research Council, p.6901-6904, 1970. *Apud* SUNSHINE, A. *Op. cit.* Ref. 71.

- 73) SWIFT, J.Q. *et al.* Effect of intra-articular versus systemic anti-inflammatory drugs in a rabbit model of TMJ inflammation. **J Oral Maxillofac Surg**, Philadelphia, v.56, p.1288-1295, 1998.
- 74) TAMBELI, C.H.; TSAI, C.M.; HU, J.W. Central opioid modulation of mustard oil-evoked jaw muscle activity. **J Dent Res**, Washington, v.76, Special Issue, p.171, 1997. Abstract.
- 75) TEIXEIRA, M.J.; OKADA, M.; TEIXEIRA, W.G.J. Eficácia analgésica e tolerabilidade do tramadol. **Rev Bras Med**, São Paulo, v.56, n.4, p.287-293, abr. 1999.
- 76) TOMAZZI, A.F. **Diagnóstico em patologia bucal**. São Paulo: Artes Médicas, 1988. p.501-535.
- 77) TSAI, C.M. *et al.* Involvement of trigeminal subnucleus caudalis (medullary dorsal horn) in craniofacial nociceptive reflex activity. **Pain**, Amsterdam, v.81, p.115-8, 1999.
- 78) VASQUEZ, E.; VANEGAS, H. The antinociceptive effect of PAG-microinjected dipyrone in rats is mediated by endogenous opioids of the rostral ventromedial medulla. **Brain Res**, Amsterdam, v.854, n.1-2, p.249-252, Jan. 2000.
- 79) VOORHEES, F. *et al.* Tramadol hydrochloride: efficacy compared to codeine sulfate, aspirin and codeine phosphate, and placebo in dental extraction. **Clin Pharmacol Ther**, Saint Louis, v.51, p.122, 1992.
- 80) VOS, P.B.; HANS, G.; ADRIAENSEN, H. Behavioral assessment of facial pain in rats: face grooming patterns after painful and non-painful sensory disturbances in the territory of the rat's infraorbital nerve. **Pain**, Amsterdam, v.76, p.173-178, 1998.

- 81) WHEELER-ACETO, H. *et al.* The rat paw formalin test; comparison of noxious agents. **Pain**, Amsterdam, v.40, p.229-238, 1989.
- 82) WHEELER-ACETO, H.; COWAN, A. Standardization of the rat paw formalin test for the evaluation of analgesics. **Psychopharmacology (Berl)**, Berlin, v.104, n.1, p.35-44, 1993.
- 83) WOOLF, C.J.; WALL, P.D. Relative effectiveness of C primary afferent fibers of different origins in evoking a prolonged facilitation of the flexor reflex in the rat. **J Neurosci**, New York, v.6, p.1433-1442, 1986.
- 84) WYNN, R.L. Tramadol – A new kind of analgesic. **Pharmacol. Gen Dent**, Chicago, v.44, n.3, p.216-220, May/June 1996.
- 85) YU, X.M. *et al.* Administration of opiate antagonist naloxone induces recurrence of increased jaw muscle activities related to inflammatory irritant application to rat TMJ region. **J Neurophysiol**, Bethesda, v.72, p.1430-1433, 1994.
- 86) YU, X.M. *et al.* Effects of inflammatory irritant application to the rat TMJ on jaw and neck muscle activity. **Pain**, Amsterdam, v.60, p.143-149, 1995.
- 87) YU, X.M. *et al.* Involvement of NMDA receptor mechanisms in jaw electromyographic activity and plasma extravasation induced by inflammatory irritant application to temporomandibular joint region of rats. **Pain**, Amsterdam, v.68, p.169-178, 1996.
- 88) YU, X.M.; SESSLE, B.J.; HU, J.W. Differential effects of cutaneous and deep application of inflammatory irritant on mechanoreceptive field properties of trigeminal brain stem nociceptive neurons. **J Neurophysiol**, Bethesda, v.70, p.1704-1707, Oct. 1993.

- 89) ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals, **Pain**, Amsterdam, v.16, p.109-110, 1983.

ANEXO

Ficha utilizada para quantificar as respostas comportamentais, induzidas pela administração de óleo de mostarda na região da ATM de ratos, durante o período de observação de 45 minutos.

DATA: / /

GRUPO:

PESO: g

	0-3	3-6	6-9	9-12	12-15	15-18	18-21	21-24	24-27	27-30	30-33	33-36	36-39	39-42	42-45
CO															
LC															

CO: comportamento de coçar a região orofacial (segundos)

LC: comportamento de levantar rapidamente a cabeça (número de vezes)

OBSERVAÇÕES:



Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 270 - 1, sobre "Efeito dos analgésicos Sinal e Dipirone nas posturas comportamentais nociceptivas induzidas pela administração de óleo" sob a responsabilidade de Maria Cecília Finay de Almeida Lima está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 05.07.01.... Este certificado expira em 04.07.2002

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 270 - 1, entitled "Effect of the analgesics Sinal and Dipirone on nociceptive behaviors induced by administration of mustard oil on rats TMJ" is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on 05.07.01.. This certificate expires on 04.07.2002
(d) (m) (y)

Campinas, 05 de junho de 2001

Profa. Dra. Alba R. M. Souza Brito
Presidente - CEEA/IB/UNICAMP

Prof. Dr. Armando Ferreira Lima
Secretário - CEEA/IB/UNICAMP

APÊNDICE

Tabelas suplementares dos resultados individuais da amostra.

TABELA 1. Valores individuais do efeito da administração de diferentes concentrações de óleo de mostarda na região da ATM de ratos sobre o comportamento de levantar rapidamente a cabeça (nº de vezes).

Animais	Controle Óleo mineral	OM 1,5%	OM 2,5%	OM 4,5%
1	3	28	65	73
2	2	27	64	72
3	2	31	58	62
4	1	24	61	80
5	1	21	70	70
6	1	33	57	109
Média ± EP	1,667 ± 0,333	27,333 ± 1,801	62,500 ± 1,979	77,667 ± 6,697

TABELA 2. Valores individuais do efeito da administração de diferentes concentrações de óleo de mostarda na região da ATM de ratos sobre o comportamento de coçar a região orofacial (segundos).

Animais	Controle Óleo mineral	OM 1,5%	OM 2,5%	OM 4,5%
1	4,22	87,36	169,51	233,56
2	7,5	85,2	193,02	147,33
3	5,58	137,96	181	136,76
4	5,34	67,01	154,21	145,71
5	2,13	106,12	205,84	127,98
6	3,34	80,73	195	299,34
Média ± EP	4,685 ± 0,768	94,063 ± 10,174	183,097 ± 7,705	181,780 ± 28,232

TABELA 3. Valores individuais da resposta comportamental (avaliada pela soma dos comportamentos de CO e LC) induzida pela administração de diferentes concentrações de óleo de mostarda na região da ATM de ratos (segundos).

Animais	Controle Óleo mineral	OM 1,5%	OM 2,5%	OM 4,5%
1	7,22	115,36	234,51	306,56
2	9,5	112,2	257,02	219,33
3	7,58	168,96	239	198,76
4	6,34	91,01	215,21	225,71
5	3,13	127,12	275,84	197,98
6	4,34	113,73	252	408,34
Média ± EP	6,368 ± 1,066	121,397 ± 10,643	245,597 ± 8,517	259,447 ± 33,959

TABELA 4. Valores individuais do efeito da pré-administração sistêmica (30min. – i.p) de diferentes concentrações de dipirona (19, 57 e 95 mg/kg) seguida da aplicação de OM 2.5% na região da ATM de ratos sobre o comportamento de levantar rapidamente a cabeça (nº de vezes).

Animais	Controle OM 2.5% + Sal.	Dipirona 19 mg/kg	Dipirona 57 mg/kg	Dipirona 95 mg/kg
1	63	45	32	13
2	57	52	29	11
3	67	46	32	15
4	56	44	38	18
5	59	48	33	11
6	60	43	44	12
média ± EP	60,333 ± 1,667	46,333 ± 1,333	34,667 ± 2,216	13,333 ± 1.116

TABELA 5. Valores individuais do efeito da pré-administração sistêmica (30min. – i.p) de diferentes concentrações de dipirona (19, 57 e 95 mg/kg) seguida da aplicação de OM 2.5% na região da ATM de ratos sobre o comportamento de coçar a região orofacial (segundos).

Animais	Controle OM 2.5% + Sal.	Dipirona 19 mg/kg	Dipirona 57 mg/kg	Dipirona 95 mg/kg
1	295,68	244,94	88,89	10,9
2	321,22	256,04	104,18	13,29
3	333,18	219,34	77,01	21,58
4	301,29	225,64	100,57	14,81
5	309,6	223,28	87,59	19,77
6	328,64	217,1	73,97	15,19
média ± EP	314,935 ± 6,180	231,057 ± 6,426	88,702 ± 4,951	15,923 ± 1,641

TABELA 6. Valores individuais da resposta comportamental (avaliada pela soma) induzida pela pré-administração sistêmica (30 min. / i.p.) de diferentes concentrações de dipirona e óleo de mostarda 2,5% na região da ATM de ratos (segundos).

Animais	Controle OM 2,5% + SALINA	Dipirona 19 mg/kg	Dipirona 57mg/kg	Dipirona 95 mg/kg
1	358,68	289,94	120,89	23,9
2	378,22	308,04	133,18	24,29
3	400,18	265,34	109,01	36,58
4	357,29	269,64	138,57	32,81
5	368,6	271,28	120,59	30,77
6	388,64	260,1	117,97	27,19
Média ± EP	375,268 ± 6,955	277,390 ± 7,390	123,368 ± 4,384	29,257 ± 2,051

TABELA 7. Valores individuais do efeito da pré-administração sistêmica (30min. – i.p) de diferentes concentrações de tramadol (5, 7.5 e 10 mg/kg) seguida da aplicação de OM 2.5% na região da ATM de ratos sobre o comportamento de levantar rapidamente a cabeça (nº de vezes).

Animais	Controle OM 2.5% + Sal.	Tramadol 5 mg/kg	Tramadol 7.5 mg/kg	Tramadol 10 mg/kg
1	63	26	9	6
2	57	24	8	3
3	67	31	10	5
4	56	25	13	10
5	59	23	10	4
6	60	26	12	4
média ± EP	60,333 ± 1,667	25,833 ± 1,138	10,333 ± 0,760	5,333 ± 1,022

TABELA 8. Valores individuais do efeito da pré-administração sistêmica (30min. – i.p) de diferentes concentrações de tramadol (5, 7.5 e 10 mg/kg) seguida da aplicação de OM 2.5% na região da ATM de ratos sobre o comportamento de coçar a região orofacial (segundos).

Animais	Controle OM 2.5% + Sal.	Tramadol 5 mg/kg	Tramadol 7.5 mg/kg	Tramadol 10 mg/kg
1	295,68	110,79	62,17	31,26
2	321,22	111,91	51,55	20,37
3	333,18	130,55	63,85	38,92
4	301,29	110,52	40,86	31,77
5	309,6	116,51	41,58	21,65
6	328,64	126,31	52,56	23,91
média ± EP	314,935 ± 6,180	117,765 ± 3,528	52,095 ± 3,987	27,980 ± 2,940

TABELA 9. Valores individuais da resposta comportamental (avaliada pela soma) induzida pela pré-administração sistêmica (30 min. / i.p.) de diferentes concentrações de tramadol e óleo de mostarda 2,5% na região da ATM de ratos (segundos).

Animais	Controle OM 2.5% + Sal.	Tramadol 5 mg/kg	Tramadol 7.5 mg/kg	Tramadol 10 mg/kg
1	358,68	136,79	71,17	37,26
2	378,22	135,91	59,55	23,37
3	400,18	161,55	73,85	43,92
4	357,29	135,52	53,86	41,77
5	368,6	139,51	51,58	25,65
6	388,64	152,31	64,56	27,91
média ± EP	375,268 ± 6,955	143,598 ± 4,418	62,428 ± 3,700	33,313 ± 3,589

TABELA 10. Valores individuais da resposta comportamental caracterizada pelo ato de levantar rapidamente a cabeça induzida pela co-administração de QX-314 2% e óleo de mostarda 5 % na região da ATM de ratos ou pela administração intraperitoneal de morfina 30 minutos antes da administração periarticular de óleo de mostarda 2,5 % (nº de vezes).

Animais	OM 5% + Sal. C1	QX-314 2 %	Morfina	OM 2.5% +Sal C2
1	50	13	3	63
2	57	18	4	57
3	46	15	2	67
4	52	12	3	56
5	48	11	5	59
6	50	10		60
média±EP	49,667 ± 1,978	13,167 ± 1,195	3,400 ± 0,510	60,333 ± 1,667

C1 – grupo controle do QX-314 2%

C2 – grupo controle da morfina

TABELA 11. Valores individuais da resposta comportamental caracterizada pelo ato de coçar a região orofacial induzida pela co-administração de QX-314 2 % e óleo de mostarda 5% na região da ATM de ratos ou pela administração de morfina 30 minutos antes da administração periarticular de óleo de mostarda 2,5 % (segundos).

Animais	OM 5% + Sal. C1	QX-314 2 %	Morfina	OM 2.5% +Sal C2
1	252,54	124,72	68,84	295,68
2	252,56	117,34	73,54	321,22
3	248,95	130,81	58,74	333,18
4	235,65	127,35	55,57	301,29
5	229,28	138,95	84,9	309,6
6	217,88	117,57		328,64
média±EP	239,492 ± 5,828	126,123 ± 3,368	68,318 ± 5,276	314,935 ± 6,180

C1 – grupo controle do QX-314 2%

C2 – grupo controle da morfina