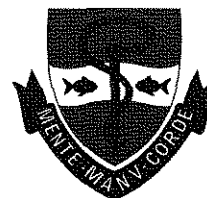




UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



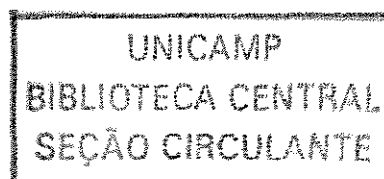
DANIELA DE CASSIA FAGLIONI BOLETA CERANTO
Cirurgiã-Dentista

**“MENSURAÇÃO DO NÍVEL DE ANSIEDADE EM RATOS,
SOB INFLUÊNCIA DA NOCICEPÇÃO EM TECIDOS
OROFACIAIS SUPERFICIAIS E PROFUNDOS”**

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba da
Universidade Estadual de Campinas,
para obtenção do grau de Doutor em
Odontologia, área de concentração
Fisiologia Oral.

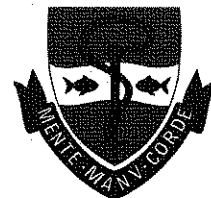
Piracicaba-SP

-2004-





UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



DANIELA DE CASSIA FAGLIONI BOLETA CERANTO
Cirurgiã-Dentista

**“MENSURAÇÃO DO NÍVEL DE ANSIEDADE EM RATOS,
SOB INFLUÊNCIA DA NOCICEPÇÃO EM TECIDOS
OROFACIAIS SUPERFICIAIS E PROFUNDOS”**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade
Estadual de Campinas, para obtenção do grau de Doutor em Odontologia, área de
concentração Fisiologia Oral.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fernanda Klein Marcondes

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Cecília Ferraz de Arruda Veiga

Comissão Examinadora:

Prof. Dr.: Eduardo Dias de Andrade
Prof. Dr.: Laerte Luiz Bremm
Prof^a. Dr.^a: Maria Beatriz Duarte Gavião
Prof^a. Dr.^a Miriam Ribeiro Campos

Suplentes:

Prof. Dr.: Francisco Carlos Groppo
Prof. Dr.: Ricardo Sampaio de Souza

Piracicaba-SP
-2004-

Este exemplar foi devidamente corrigido.
de acordo com a Resolução CCPG-036/83
CPG, 11/01/2005
Fernanda Klein Marcondes
Assinatura do Orientador

UNIDADE BC
 CHAMADA Unicamp
C334m

EX
 OMBO BC/ 61805
 ROC. 16-86-05
 C ☐ D ☒
 REÇO 11.00
 DATA 10-2-05
 1ª CPD _____

ibid: 341087

Ficha Catalográfica

C334m Ceranto, Daniela de Cassia Faglioni Boleta.
 Mensuração do nível de ansiedade em ratos, sob influência da nocicepção em tecidos orofaciais superficiais e profundos. / Daniela de Cassia Faglioni Boleta Ceranto. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2004. ix, 97p. : il.

Orientadores : Profª Drª Fernanda Klein Marcondes, Profª Drª Maria Cecília Ferraz de Arruda Veiga.
 Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Fisiologia odontológica. 2. Dor. 3. Ansiedade. I. Marcondes, Fernanda Klein. II. Veiga, Maria Cecília Ferraz de Arruda. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

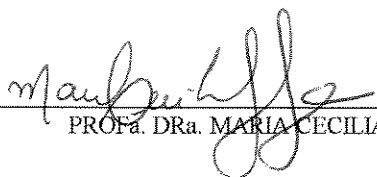
Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marilene Girello CRB/8-6159, da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.

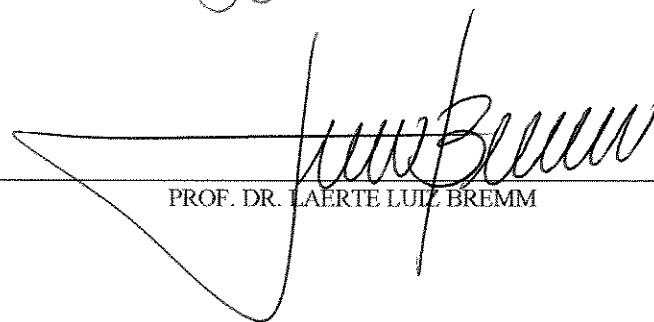


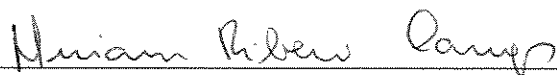
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, em sessão pública realizada em 27 de Outubro de 2004, considerou a candidata DANIELA DE CASSIA FAGLIONI BOLETA CERANTO aprovada.


PROFa. DRa. MARIA CECILIA FERRAZ ARRUDA VEIGA


PROF. DR. LAERTE LUIZ BREMM


PROFa. DRa. MIRIAM RIBEIRO CAMPOS


PROF. DR. EDUARDO DIAS DE ANDRADE


PROFa. DRa. MARIA BEATRIZ DUARTE GAVIAO

200502867

DEDICATÓRIA

“Ao meu esposo Ricardo, por ter compreendido os momentos de ausência, por ter sido paciente com a minha impaciência e por ter me apoiado sempre com muito amor e carinho”

“Aos meus pais, Antonio e Therezinha, aos quais devo tudo o que sou e sempre serei extremamente grata pelo consolo nos momentos difíceis”

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À prof.^a Dr.^a Maria Cecília Ferraz de Arruda Veiga,
qualquer que seja a frase que eu escreva para te
agradecer, não conseguirá expressar o que sinto...
Deixo as palavras de Samuel Smiles para demonstrar
o que aprendi com sua atitude:

*“Aprendemos a sabedoria com o fracasso, muito mais do
que com o sucesso. Descobrimos o que fazer descobrindo o
que não fazer e provavelmente aquele que nunca cometeu
um erro, nunca fez uma descoberta.”*

Ao meu grande amigo Fábio José Bianchi, meu eterno
agradecimento, pois se não fosse você, tenho absoluta
certeza, este trabalho jamais chegaria ao fim.

AGRADECIMENTOS

Aos professores doutores Antonio Bento Alves de Moraes; Maria Cristina Volpato, Cecília Gatti Guirado, Eduardo Dias de Andrade, Francisco Carlos Groppo, Laerte Luiz Bremm, Maria Beatriz Duarte Gavião, Miriam Ribeiro Campos, Ricardo Sampaio de Souza, por dispensarem seu tempo na análise do trabalho e pelas sugestões dadas.

À professora Doutora Fernanda Klein Marcondes, por ter iniciado este trabalho.

Às secretárias Eliete Rigetto, Érica A. Pinho Sinhoreti, Maria Elisa dos Santos, Raquel Q. Marcondes Cesar Sacchi pela colaboração sempre pronta e indispensável.

Ao senhor Carlos Alberto Feliciano, pela ajuda não somente técnica, mas também moral, meu muito obrigada.

À Heloísa Maria Ceccoti, pela revisão das referências bibliográficas.

Aos meus colegas de trabalho da universidade, muitos dos quais são mais que colegas, são meus amigos, minha segunda família... Meu muito obrigada.

À Universidade Paranaense (UNIPAR) por ter permitido ausentar-me parcialmente de minhas atividades para a realização deste trabalho.

À UNICAMP por ter me acolhido e me permitido aprender muito durante esses cinco anos.

Agradeço a todos aqueles que me deram forças para continuar e também agradeço àqueles que fizeram o possível para eu desistir... Quanto maiores são as barreiras melhor é o sabor da vitória!!!

Sumário:

Lista de abreviaturas	01
Lista de figuras	02
Lista de tabelas	04
RESUMO	05
ABSTRACT	07
1. INTRODUÇÃO	09
2. REVISÃO DA LITERATURA	11
2.1 Conceito de Dor	11
2.2 Dor e Disfunção Temporomandibular	16
2.3 Neurobiologia da Dor Orofacial	19
2.3.1 Sensibilização Periférica	27
2.3.2 Sensibilização Central	28
2.4 Ansiedade	31
2.4.1 Conceito de ansiedade: o normal e o patológico	31
2.4.2 Ansiedade e Transmissão gabaérgica	36
2.5 Modelos animais	39
2.5.1 Modelos animais de dor	39
2.5.1.a. Teste da Formalina	40
2.5.2 Modelos animais de ansiedade	43
2.5.2.a. Labirinto em Cruz Elevado	44
3. PROPOSIÇÕES	48
4. MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1 Animais	49
4.2 Delineamento experimental	49
4.2.1. Experimento 01 – Avaliação dos grupos controles	49
4.2.2. Experimento 02 – Avaliação da influência da	50
nocicepção na região orofacial sobre o nível de ansiedade em ratos.	

4.2.3. Experimento 03 – Validação Farmacológica	51
4.3 Procedimentos experimentais	51
4.3.1 Administração do agente algésico	51
4.3.2 Administração do agente ansiolítico	53
4.3.3 Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE)	53
4.4 Soluções utilizadas	55
4.5 Análise estatística	56
5. RESULTADOS	57
5.1 Efeito da anestesia com halotano e da inserção da agulha sobre a atividade locomotora e ansiedade dos animais.	57
5.2 Efeito da injeção de formalina no lábio e na ATM sobre o nível de ansiedade de ratos submetidos ao teste do LCE.	58
5.3 Efeito do diazepam sobre a ansiedade induzida por dor na região do lábio e da ATM de ratos submetidos ao teste do LCE.	60
6. DISCUSSÃO	62
7. CONCLUSÕES	71
8. REFERÊNCIAS	72
ANEXO 1 – Protocolo de Aprovação do Comitê de Ética em Experimentação animal	88

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT	-	Serotonina
ATM	-	Articulação Temporomandibular
BDZs	-	Benzodiazepínicos
BK	-	Bradicinina
CPME	-	Substância Cinzenta da Medula Espinhal
DTMs	-	Disfunções Temporomandibulares
FR	-	Formação Reticular
GABA	-	Ácido Gama-Aminobutírico
i.p.	-	Intraperitoneal
LCE	-	Labirinto em Cruz Elevado
NE	-	Neurônio Nociceptivo-Específico
NMDA	-	N-metil-D-aspartato
NTE	-	Núcleo do Trato Espinhal
ON	-	Óxido nítrico
PKC	-	Creatinofosfocinase
s.c.	-	Subcutâneo
SIC	-	Sistema de Inibição Comportamental
SNC	-	Sistema Nervoso Central
SP	-	Substância P
SST	-	Sistema Sensitivo Trigeminal
VDA	-	Neurônio de Variação Dinâmica Ampla

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01-	O coração como o centro das sensações, gravura alemã do século XV.	11
FIGURA 02-	Esquema de condução da dor proposto por Descartes, publicado após sua morte em “De Homine” (1662).	12
FIGURA 03-	Modelo conceitual dos determinantes sensoriais, motivacionais e de controle central da dor.	14
FIGURA 04-	Principal via somatossensorial da boca e face. Os aferentes primários do trigêmeo (V) têm seus corpos celulares no gânglio trigeminal e se projetam para os neurônios de segunda ordem no complexo nuclear sensorial V do tronco encefálico.	21
FIGURA 05-	Representação do núcleo do trato espinhal, constituído pelos subnúcleos: oral, interpolar e caudal.	23
FIGURA 06-	Representação gráfica do nervo trigêmeo (nervo cranial V) entrando no tronco encefálico (TE) ao nível da ponte.	25
FIGURA 07-	Mecanismo de sensibilização periférica.	27
FIGURA 08-	Mecanismo de sensibilização central.	29
FIGURA 09-	Sistema de inibição comportamental.	34
FIGURA 10-	Diagrama representando o sistema cerebral de defesa.	36
FIGURA 11-	Representação esquemática da terminação GABAérgica. O sítio de reconhecimento do GABA e dos BDZs estão situados em diferentes subunidades, que interagem entre si por mecanismos alostéricos.	38
FIGURA 12-	Agulha calibre 30 acoplada a uma microseringa Hamilton (50 µL) por intermédio de uma cânula de polietileno PE50.	52
FIGURA 13-	Administração do agente algésico no lábio.	52
FIGURA 14-	Administração do agente algésico na ATM.	52
FIGURA 15-	Labirinto em Cruz Elevado. Braços abertos, sem paredes verticais (a) e braços fechados, com paredes verticais (f).	54
FIGURA 16-	Média ($\pm$ E.P.M.) porcentagem de tempo nos braços abertos (A), porcentagem de entradas nos braços abertos (B) e número de entradas nos braços fechados (C), dos grupos controle, controle anestesia e agulha durante o teste do LCE. (* $p < 0.05$).	58

FIGURA 17-	Média ($\pm$ E.P.M.) porcentagem de tempo nos braços abertos (A), porcentagem de entradas nos braços abertos (B) e número de entradas nos braços fechados (C), dos grupos controle anestesia (CA), salina lábio (SL), formalina lábio (FL), salina ATM (SATM) e formalina ATM (FATM) durante o teste do LCE. (* $p < 0.05$).	59
FIGURA 18-	Figura 18: Média ($\pm$ E.P.M.) porcentagem de tempo nos braços abertos (A), porcentagem de entradas nos braços abertos (B) e número de entradas nos braços fechados (C), dos grupos controle anestesia (CA), formalina lábio (FL), formalina lábio propileno (FLP), formalina lábio diazepam (FLD), formalina ATM (FATM) e formalina ATM diazepam (FATMD), durante o teste do LCE. (* $p < 0.05$).	61

LISTA DE TABELAS

TABELA 01-	Classificação dos transtornos de ansiedade segundo o <i>Diagnostic Statistical Manual</i> .	32
TABELA 02-	Grupos experimentais para estudo dos parâmetros analisados pelo LCE sob influência da anestesia com halotano e do trauma físico induzido pela injeção da agulha na região da ATM	50
TABELA 03-	Grupos experimentais para estudo da ansiedade provocada pela nocicepção em tecido orofacial superficial e profundo.	50
TABELA 04-	Grupos experimentais para avaliação do efeito do diazepam sobre o nível de ansiedade, após a administração de formalina na região orofacial.	51
TABELA 05-	Valores médios da %TBA, %EBA e NEBF dos grupos controle (GC), controle anestesia (GCA) e agulha (GAg), submetidos ao teste do LCE. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão.	57
TABELA 06-	Valores médios da %TBA, %EBA e NEBF dos grupos controle anestesia (GCA), salina lábio (SL), formalina lábio (FL) e formalina ATM (FATM), submetidos ao teste do LCE após a administração de formalina 1% na região orofacial. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão.	59
TABELA 07-	Valores médios da %TBA, %EBA e NEBF dos grupos controle anestesia (GCA), salina lábio (SL), formalina lábio (FL), formalina lábio propileno (FLP), formalina lábio diazepam (FLD), formalina ATM (FATM) e formalina ATM diazepam (FATMD), submetidos ao teste do LCE após a administração de formalina 1% na região orofacial. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão.	60

RESUMO

Estudos têm analisado a probabilidade da ansiedade desempenhar um papel nas respostas dolorosas, contudo não há trabalhos avaliando a influência da dor orofacial, sobre o nível de ansiedade em ratos. Portanto, o objetivo do presente estudo foi determinar a influência da nocicepção na região orofacial sobre o nível de ansiedade de ratos Wistar. A nocicepção foi induzida pela injeção de formalina 1%. O nível de ansiedade foi medido utilizando o teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE). Primeiramente, foram analisados animais de um grupo controle (CG) (não submetidos a nenhum tipo de tratamento), grupo controle anestesia (GCA) (submetidos à anestesia por inalação de halotano) e grupo agulha + anestesia (GAg) (animais que sofreram a introdução da agulha na região da articulação temporomandibular (ATM)), para verificar se a anestesia e/ou o trauma físico causado pela inserção da agulha eram capazes de influenciar nos parâmetros analisados pelo teste do LCE. Tanto o halotano quanto a introdução da agulha na região da ATM não alteraram os parâmetros analisados pelo LCE ($p > 0,05$, teste de Tukey), indicando que estes procedimentos não influem na ansiedade nem na atividade locomotora dos animais. Na seqüência, outros grupos de animais foram testados. Após serem anestesiados por inalação de halotano, dependendo do grupo ao qual pertenciam, os ratos receberam injeção de 50 μ L de salina (0,9%) ou 50 μ L de formalina 1% no lábio (injeção subcutânea) ou na região da ATM (injeção periarticular), 30 minutos antes de serem submetidos ao teste do LCE. Os dados obtidos a partir destes experimentos foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey. Os resultados mostraram que a nocicepção induzida pela injeção de formalina 1% no lábio e na ATM aumentou de forma estatisticamente significativa o nível de ansiedade, medido pela porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos e pela porcentagem de entradas nos braços abertos do LCE ($p < 0,05$), porém não alterou a atividade locomotora geral dos animais, medida por meio do número de entradas nos braços fechados do LCE ($p > 0,05$, teste de Tukey). A administração intraperitoneal de diazepam

(1mg/Kg) reduziu, de maneira estatisticamente significativa ($p < 0,05$, teste de Tukey) a ansiedade induzida pela nocicepção na região orofacial, contudo não influenciou na atividade locomotora dos animais submetidos ao teste do LCE. Concluiu-se que a nocicepção na região orofacial, induzida pela injeção de formalina 1% no lábio e na ATM, aumenta os níveis de ansiedade, que pode ser reduzida pela administração de diazepam.

ABSTRACT

The literature indicates an important interrelation between orofacial pain and psychological alterations, amongst them anxiety. Studies have analyzed the probability of the anxiety playing a role in the painful answers, however there are not works analyzing the influence of orofacial pain on the anxiety level. Thus, the aim of the present study was to determine the influence of orofacial nociception on the anxiety level of male Wistar rats. Orofacial nociception was induced by formalin, that is a noxious stimulus widely used in animal behavioral experiments for studying pain mechanisms. Anxious behavior was measured using the Elevated Plus-Maze Test (EPM). Firstly it had been analyzed animals of control group (CG) (not submitted to any type of treatment), control anesthesia (CAn) (submitted to the anesthesia by halotane inhalation) and needle (GN) (they only had received the introduction of a needle into the temporomandibular joint (TMJ) region), to verify if the anesthesia and/or the physical trauma caused by the needle insertion were capable to influence the parameters analyzed by EPM test. Neither the halotane nor the needle introduction into TMJ region altered the parameters analyzing by EPM test, which indicated that these procedures were not able to alter both anxiety and motor activity of rats submitted to the EPM ($p > 0.05$, Tukey's test). Secondly, other groups of animals were tested, the rats were anesthetized by inhalation of halothane and 50 μ L of NaCl (0.9%) or 50 μ L of 1% formalin were administrated subcutaneously into the lip or TMJ region, correspondent to the group that the animal belonged, 30 min before being submitted to EPM test. Data from this experiment were analyzed by the Two-Way analyses of variance and Tukey test. Results in the presente study showed the formalin injection into the lip and TMJ region significantly increased the level of anxiety, measured by the percentege of time spent in the open arms and by the percentage of entrance in the open arms of EPM, but not the general activity measured by the number of entrances in the closed arms ($p < 0.05$, Tukey's test), which indicated that orofacial pain is able to increase the level of anxiety, without interfering in the locomotor activity. The

anxiety response was significantly reduced ($p < 0.05$, Tukey's test) by the administration of intraperitoneal Diazepam (1 mg/kg), just after lip/TMJ formalin injection. In conclusion, this study demonstrated that the orofacial nociception induced by the injection of 1% formalin into the lip or TMJ region is able to increase the level of anxiety in rats and the Diazepam administration can reduced this anxiety response.

1. INTRODUÇÃO

Na prática odontológica, um dos principais fatores que motivam o paciente a procurar um profissional é a dor, que muito freqüentemente vem acompanhada por um quadro de ansiedade.

A literatura especializada apresenta diferentes definições para estes estados, sendo que o mais aceito como dor é *“uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano tecidual real ou potencial ou descrita tal como se o dano estivesse presente”* (Mersk, 1986) e como ansiedade *“um estado emocional subjetivamente vivenciado como desagradável ou ameaçador, que inclui sintomas como alteração do humor e da cognição geralmente acompanhados por alterações comportamentais e fisiológicas, tais como palpitações, sudorese e hipervigilância”* (Pratt, 1992).

Os níveis, tanto de dor quanto de ansiedade, dependem de uma série de fatores, sendo extremamente subjetivos e podendo refletir na qualidade de vida do indivíduo, como nos casos de pacientes portadores de disfunção miofacial e bruxismo (Dao *et al*, 1994).

Não se pode negar que há uma inter-relação entre a dor e a ansiedade durante o tratamento odontológico, mas não há trabalhos na literatura descrevendo se os altos níveis de ansiedade são as causas dos sintomas dolorosos ou se a presença dos sintomas é que altera estes níveis.

Há de se mencionar que estudos sobre dor e ansiedade em seres humanos envolvem, além de problemas éticos, uma série de outras variáveis, às quais todos estão sujeitos (fatores culturais, sócio-econômicos, psicológicos, entre outros). Por essa razão, modelos em animais de laboratório são úteis ao estudo da importância relativa dos vários fatores de maneira mais controlada e restrita (Thrane *et al*, 1996).

Dentre os modelos para estudo da dor, o teste da formalina é um método confiável para avaliar dor em várias partes do corpo e tem sido utilizado com sucesso em muitos estudos (Clavelou *et al*, 1989; Cadet *et al*, 1993; Clavelou *et al*, 1995; Roveroni *et al*, 2001).

Com relação à ansiedade o teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE) é um procedimento validado do ponto de vista comportamental, fisiológico e farmacológico, para mensurar ansiedade em ratos (Pellow *et al*, 1985).

Traçadas estas considerações e observando a inexistência de trabalhos na literatura relacionando a influência da dor orofacial sobre os níveis de ansiedade em animais, o objetivo deste trabalho foi verificar o quanto a nocicepção na região orofacial, induzida por injeção de formalina 1% no lábio e na articulação temporomandibular (ATM) de ratos, é capaz de alterar os níveis de ansiedade, analisados através do teste do LCE, bem como avaliar o papel do diazepam neste processo.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Conceito de Dor

Compreender a dor é preocupação antiga do ser humano. O homem primitivo associava-a dor com lesão tecidual acidental, mas a interpretava como decorrente da entrada de fluidos mágicos ou de espíritos demoníacos no interior do corpo. Orações, sacrifícios aos deuses, uso de amuletos e talismãs, práticas de exorcismo, ou mesmo a sangria para retirada dos fluidos maus eram então preconizadas para seu controle. Sucos de ervas naturais, como papoula, mandrágora, haxixe e melmendo foram freqüentemente utilizados para o controle da dor (Ojugas, 1999).

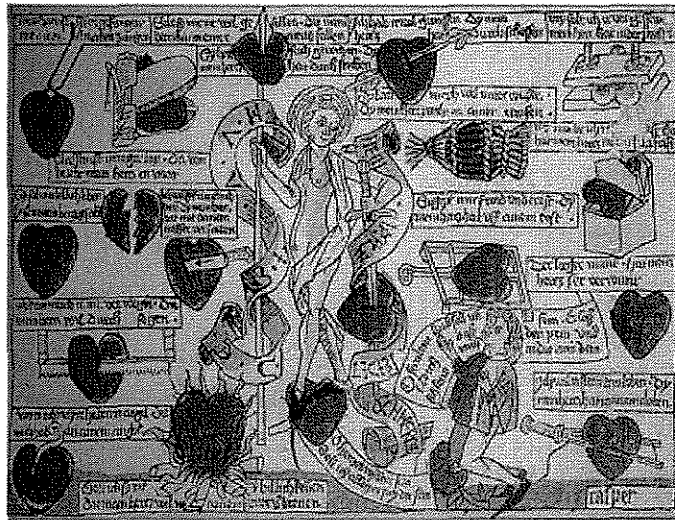


Figura 01. O Coração como o centro das sensações, gravura alemã do século XV (FONTE: Ojugas, 1999).

Aristóteles interpretou a dor como experiência oposta ao prazer, tipicamente desagradável e sentida pelo coração como qualidade ou paixão da alma (Figura 01). A idéia do coração como centro das sensações perdurou por cerca de 23 séculos e recebeu apoio de importantes pensadores. Em contrapartida, não foi menor o número dos que defenderam a idéia do cérebro como centro das sensações. Estudos anatômicos e fisiológicos realizados por

Descartes (1606-1650) evidenciaram a existência de nervos capazes de receber informações sensoriais desde a periferia e levá-las até o cérebro. Para Descartes, vias nervosas específicas conduziriam a dor até o cérebro (Figura 02).

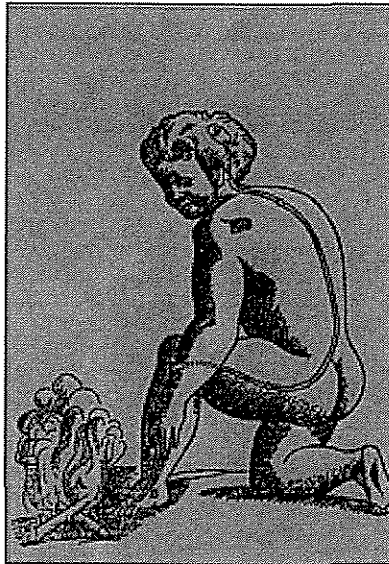


Figura 02. Esquema de condução da dor proposto por Descartes, publicado após sua morte em "De Homine" (1662) (FONTE: Ojugas, 1999).

Uma visão simplificada do histórico da dor evidencia que, até a Idade Média, enfatizou-se o aspecto emocional da dor em detrimento ao aspecto sensorial. Desde então passou-se a reconhecer a dor como sensação de alerta e proteção do organismo contra o dano físico. Até bem recentemente, a ligação entre lesão e dor era tão óbvia que se estabeleceu a noção de que dor era sempre resultado de dano físico, e sua intensidade proporcional ao grau de lesão tecidual. Diversas evidências, no entanto, contrapõe-se a esta concepção (Graeff & Guimarães, 2001).

É digno de nota mencionar que existe uma salutar diferença entre *nocicepção* e *percepção dolorosa*, apesar de serem freqüentemente utilizadas como sinônimos. Muitos estímulos que agem sobre os tecidos podem ter caráter nocivo a eles – pelo menos - em um certo momento, de acordo com as características do estímulo, especialmente no que diz respeito à natureza e magnitude. A capacidade que o organismo tem de detectar e reconhecer este tipo

de estímulo é denominada *nocicepção*. Por outro lado, a *percepção dolorosa* apenas ocorre quando o indivíduo adquire conhecimento consciente do estímulo. A *percepção dolorosa* apresenta uma característica multidimensional, na qual estão envolvidos uma série de fatores endógenos (biopsíquicos) e exógenos (sócio-culturais).

À medida que melhor se conhece a fisiologia sensorial e se aprofunda na análise psicofísica da *nocicepção*, o componente afetivo é considerado como reação à dor. Como consequência disso, formulações multidimensionais da experiência dolorosa, que dão importância aos aspectos emocionais e cognitivos, tanto quanto aos aspectos sensoriais, ganham considerável espaço na literatura atual, desde o aparecimento do *modelo da comporta* proposto por Melzack e Wall, em 1965. De acordo com essa teoria, o dano ou estresse tecidual gera impulsos neurais que alcançam regiões rostrais do sistema nervoso, onde se originam os componentes sensorial-discriminativo e afetivo-emocional da resposta ao estímulo nocivo. As informações cerebrais que refletem fatores emocionais, cognitivos e atencionais descem pela medula espinhal, e modulam os impulsos aferentes que aí chegam. Dessa forma, a sensação efetivamente percebida acaba sendo a soma tória desses fatores, mais a estimulação sensorial, que depende das características específicas do estímulo. O sistema de ação responsável pela experiência da dor e pela resposta aos estímulos é disparado, quando o nível de ativação das células transmissoras da dor ou células T ultrapassa um nível crítico (Figura 03). Essas células estão sob a influência modulatória de diversos fatores, que vão desde a atividade visceral até fatores ligados à personalidade, à experiência passada, fatores culturais e cognitivos. Fatores cognitivos podem modular até mesmo simples reflexos espinhais, evidenciando uma complexa influência inibitória do cérebro sobre a entrada sensorial na medula (Graeff & Brandão, 1999).

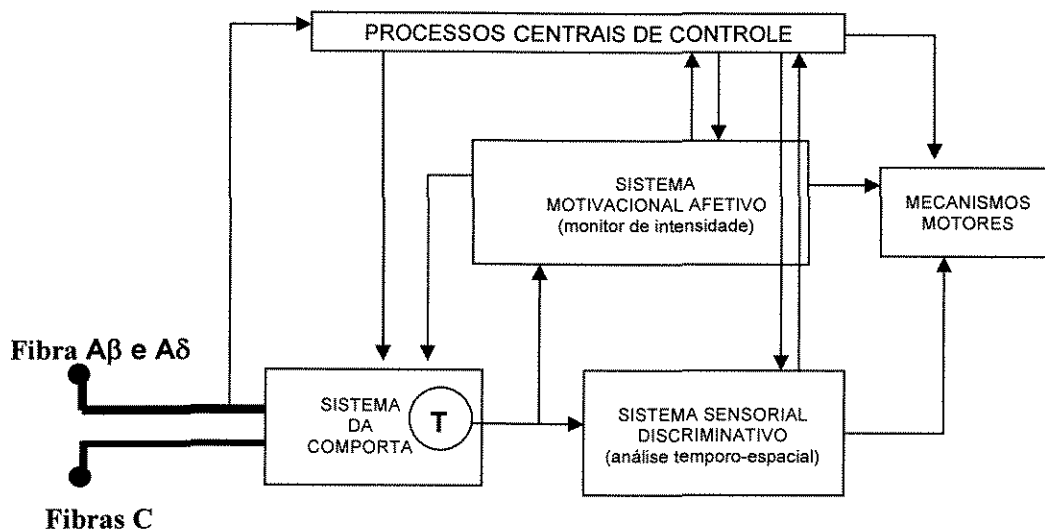


Figura 03. Modelo conceitual dos determinantes sensoriais, motivacionais e de controle central da dor. FONTE: Graeff & Brandão, 1999.

Esse modelo, também conhecido como teoria da comporta espinhal resultou no conceito bastante aceito, e de grande valor para a terapêutica, de que a experiência dolorosa é um processo multidimensional. Essa teoria confere o mesmo nível de importância às dimensões atencionais, cognitivas e emocionais que ao componente sensorial. Os sinais dolorosos podem ser radicalmente modificados, e mesmo bloqueados, nos estágios iniciais da transmissão dos impulsos nociceptivos, quando penetram no sistema nervoso central (SNC). Os impulsos provenientes das células T são transmitidos para o cérebro pelos axônios dessas células, que formam as fibras do trato ventrolateral, através de duas vias: a via espinotalâmica, cujas fibras se projetam no tálamo ventrobasal, e daí para o córtex somatossensorial, e a via paleoespinotalâmica, que se projeta na formação reticular, diversos núcleos talâmicos e sistema límbico (Brandão, 1995).

A sensibilidade à dor varia muito entre diferentes grupos socioculturais. Enquanto alguns suportam dores intensas estoicamente, outros reagem de modo exagerado a lesões insignificantes. Um mesmo indivíduo pode reagir mais ou menos intensamente ao mesmo estímulo nocivo, dependendo do estado emocional ou das circunstâncias em que ocorre a lesão. Alguns autores relatam

indivíduos que, participando de cerimônias místico-religiosas, suportam estímulos nitidamente lesivos aparentemente sem sentir dor (Graeff & Guimarães, 2001).

Em face dessas evidências, a dor não pode ser entendida como simples fenômeno sensitivo. Reconhece-se que ela possui dois componentes: o *perceptivo-discriminativo* e o *afetivo, emocional e cognitivo* (Figura 03). O primeiro permite identificar o estímulo como doloroso e localizar a região em que a lesão ocorreu e o segundo compreende ampla variedade de comportamentos, indo desde a simples retirada reflexa do segmento lesado até complexas respostas emocionais que, além de comportamentos inatos próprios de cada espécie, envolvem aprendizagem e memória. Há exemplos de lesão sem dor, como os casos de analgesia congênita em que o indivíduo não sente dor, mesmo diante de estímulos nitidamente lesivos ou exemplos de dor sem lesão aparente, como em alguns casos de dor orofacial.

A dor também pode ser considerada como um mecanismo de defesa ao organismo, visto que através dela o indivíduo percebe a ocorrência de estímulos advindos do meio externo ou do próprio meio interno que podem ser lesivos (Lent, 2001). Quando a dor é provocada por lesão tecidual, o organismo no intuito de proteger-se, desencadeia uma reação natural a ela, antes que o dano se torne maior e possivelmente mais prejudicial (Cooper, 1990), o que poderia fazer com que a dor perdesse seu caráter protetor e tornasse a própria doença (Coderre *et al*, 1993).

Em razão da complexidade do fenômeno doloroso, diversos pesquisadores reuniram-se a pedido da Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) para defini-la. Chegaram, então, à seguinte definição: “A dor é experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano tecidual real ou potencial ou descrita tal como se o dano estivesse presente” (Mersk, 1986).

Na prática odontológica, um dos principais fatores que motivam o paciente a procurar um profissional é a dor na região orofacial, seja ela odontogênica ou não odontogênica.

As dores odontogênicas, geralmente relacionadas a patologias periapicais ou periodontais são, na maioria dos casos, agudas e de fácil diagnóstico e tratamento. Contudo, as dores não odontogênicas, principalmente as provenientes de tecidos profundos, como é o caso da articulação temporomandibular (ATM), são preocupantes quanto ao tratamento, uma vez que o diagnóstico definitivo é difícil de ser obtido. Nesses casos, a dor persiste por tempo excessivamente longo e passa a representar sofrimento desnecessário, muitas vezes prejudicial ao organismo, recebendo a denominação de *dor crônica*, que diferentemente da *dor aguda* não tem a função de alertar o indivíduo para que o dano seja reduzido.

2.2. Dor e Disfunção Temporomandibular

A dor crônica é um dos principais sintomas apresentados por pacientes que sofrem de disfunções temporomandibulares (DTMs), que é um termo geral que engloba um grande número de problemas clínicos, os quais envolvem a musculatura mastigatória, a ATM e estruturas relacionadas. As DTMs têm sido identificadas como a maior causa de dor de origem não dentária na região orofacial e são consideradas como uma subclassificação das desordens músculo-esqueléticas (Bell, 1989).

A dor decorrente de DTM, como toda patologia articular e muscular, usualmente não é bem localizada e se difunde para os músculos locais, a área pré-auricular e/ou a ATM e freqüentemente é agravada pela mastigação ou por outra função mandibular. Além da dor, os pacientes apresentam com freqüência

movimentos mandibulares limitados ou assimétricos, e ruídos articulares (McNeill, 1993).

O histórico das DTMs revela um processo de evolução notável; ganhou um grande ímpeto após a publicação de Costen, em 1934, que relacionou a perda da dimensão vertical de oclusão com presença ou queixa de dor na região auricular, pressão nos ouvidos, vertigens e dificuldade no ato mastigatório. Quando esta perda era corrigida, os sintomas eram minimizados (McNeill, 1993). Pouco tempo depois, pesquisas na área de oclusão propuseram que a desarmonia oclusal, mais do que a alteração da dimensão vertical era o fator etiológico primário, e muitas técnicas restauradoras para equilibrar ou estabilizar a oclusão surgiram durante o período do final da década de 30 até a era pós Segunda Guerra Mundial (McNeill, 1993).

Entretanto, o verdadeiro papel da oclusão na etiologia das DTMs tornou-se claro no final dos anos 50, com ênfase sobre o equilíbrio ou ajuste oclusal (Krough-Poulson & Olson, 1966). Nos anos 60, a qualidade da investigação clínica e a pesquisa nas áreas básicas se tornaram cada vez mais sofisticadas (Thilander, 1961; Storey, 1968) e houve uma gradual redução da ênfase quanto ao papel da oclusão na etiologia das DTMs.

A década de 70 trouxe avanços nas técnicas de diagnóstico por imagens, o que resultou numa melhor visualização das estruturas intra-capsulares (McNeill, 1993). Tais técnicas, especialmente a imagem por ressonância magnética e a artroscopia, associadas à maior experiência no tratamento clínico, forneceram informações para um diagnóstico articular mais específico (Dworkin *et al*, 1990; Nitzan & Dolwick, 1991). Nos anos subseqüentes, tornou-se evidente que parâmetros para o diagnóstico e o tratamento das DTMS eram de essencial importância, gerando uma grande proliferação de métodos diagnósticos e terapêuticos para essas patologias. Em 1982, a American Dental Association (ADA) realizou uma conferência sobre exame, diagnóstico e tratamento das DTMs

(Griffiths, 1983). A partir de então, reconheceu-se o caráter multifatorial das dores orofaciais crônicas e o uso de programas multi e interdisciplinares se tornaram comuns para o tratamento das mesmas.

Em 1997, LeResche elaborou uma revisão sobre a distribuição e prevalência da dor temporomandibular na população. Com relação à idade, a autora demonstrou que a dor na região temporomandibular é menos freqüente entre os 7 e 17 anos, não havendo diferenças entre os sexos. Com o avançar da idade a dor tende a aumentar e há uma prevalência maior entre as mulheres comparado aos homens, sendo que a idade de pico fica em torno de 35 e 45 anos. Contudo, essa prevalência desaparece na terceira idade, o que propõe o envolvimento hormonal no desenvolvimento dessa patologia.

Em busca de confirmar esta suposição, LeResche *et al* (2003) realizaram um estudo cujo ponto principal foi averiguar a influência hormonal sobre quadros de DTMs. Os autores chegaram à conclusão de que a dor decorrente às disfunções é maior em períodos em que a taxa estrogênica está mais baixa (i.e., durante a fase menstrual) e nos períodos de alterações bruscas na taxa de estrógeno (final da fase lútea e na metade do ciclo menstrual). Estes resultados comprovam o envolvimento hormonal nos quadros dolorosos presentes em casos de DTMs, e deve ser considerado pelos profissionais que se dispõem a tratá-los.

Indivíduos com dor crônica tornam-se importante ônus para os serviços médicos, institutos de previdência e companhias de seguro. Nos EUA, cerca de 89 bilhões de dólares são destinados anualmente ao tratamento, compensações trabalhistas e litígios envolvendo doentes com dor crônica (Jensen *et al*, 1985). No Brasil, mais de 1/3 da população julga que a dor crônica compromete as atividades habituais e mais de ¾ considera que a dor crônica limita as atividades recreacionais, relações sociais e familiares (Teixeira, 2000; 2001). Devido à dor,

cerca de 50% a 60% dos doentes torna-se parcial ou totalmente incapacitado, transitória ou permanentemente (Jensen *et al*, 1985).

Em 1992, Alder *et al* sugeriram que cerca de 32% da população adulta estaria sujeita a algum tipo de DTM e que 70% dos casos seriam acompanhados por dor. Portanto, tendo em vista a relativa prevalência e os problemas, tanto para o indivíduo quanto para a sociedade, ocasionados por quadros de dor orofacial, faz-se necessário que o cirurgião dentista esteja ciente da patofisiologia da dor proveniente da região orofacial para o sucesso do tratamento desses casos.

2.3. Neurobiologia da Dor Orofacial

O complexo neuroanatômico periférico necessário para a captação e transmissão de informações dolorosas provenientes da região orofacial é formado pelos receptores sensoriais e pelas fibras nervosas de primeira ordem, cujos corpos celulares estão no gânglio trigeminal localizado no tronco encefálico (Machado, 1993).

Os estímulos nocivos de diversas naturezas (mecânicos, químicos, térmicos ou elétricos) são captados por receptores sensoriais denominados de *nociceptores*. Eles estão presentes em vários tecidos orofaciais como os cutâneos, intra-orais (mucosa e polpa dental), profundos (articulações e músculos) e cerebrovasculares (Sessle, 1995). Informações sensoriais advindas desses tecidos chegam ao sistema sensitivo trigeminal (SST) por meio de fibras nervosas aferentes do tipo C e do tipo A δ . As fibras do tipo C são fibras polimodais, de pequeno calibre, amielínicas, de velocidade de condução de 0,5 a 2,0 m/s, que respondem a estímulos de dor de origem mecânica, térmica e química e as fibras do tipo A δ são fibras mielínicas, de pequeno diâmetro, com velocidade de condução de 5 a 30m/s (Aghabeigi, 1992), estas fibras respondem a estímulos mecânicos dolorosos agudos. A sua abrangência está em uma extensão de alta frequência, que é percebida como dor. As fibras A δ , por serem mielinizadas,

transportam impulsos mais rapidamente que as fibras C (Campbell *et al*, 1992). Há também as fibras do tipo A β que são fibras mielinizadas, de grosso calibre e que conduzem as informações táteis em uma velocidade de 30 a 70m/s, envolvidas somente na transmissão de estímulos não-dolorosos de baixa-freqüência, que são interpretados como toque suave, não importando qual a freqüência e a intensidade do estímulo (Torebjork *et al*, 1992). Estímulos neurais provenientes de outros pares de nervos cranianos (VII, IX, X E XII) e de nervos cervicais superiores também podem chegar ao SST, caracterizando-o como uma grande estação receptora e transmissora de impulsos neurais (Sessle, 1996).

Recentemente, foram descobertas as fibras nociceptivas silenciosas, as quais são mecanicamente insensíveis. Elas se tornam ativas após lesões teciduais, como um estímulo doloroso adicional para o SNC (Schmidt *et al*, 1995). Os impulsos aferentes de todas estas fibras transitam pela periferia, através do gânglio trigeminal e da raiz do trigêmeo, entrando pela ponte e descendo através do trato trigeminal para entrar no núcleo trigeminal.

O complexo trigeminal do tronco encefálico pode ser subdividido em principal, ou núcleo sensorial principal e núcleo do trato espinhal (NTE). Este último constitui-se por três subnúcleos: oral, interpolar e caudal. O subnúcleo caudal é uma estrutura laminada semelhante ao corno dorsal da medula espinhal; ele se prolonga para a coluna dorsal cervical, onde se funde com o corno dorsal espinhal. A estrutura dos outros três componentes do complexo trigeminal é mais uniforme, embora as subdivisões em cada uma possam ser diferenciadas em algumas espécies (Darian-Smith, 1966; Sessle, 2000). Cada componente também recebe fibras de outro centro encefálico ou de centros cerebrais superiores que fornecem parte da essência para influências moduladoras nos neurônios do complexo trigeminal do tronco encefálico (Figura 04).

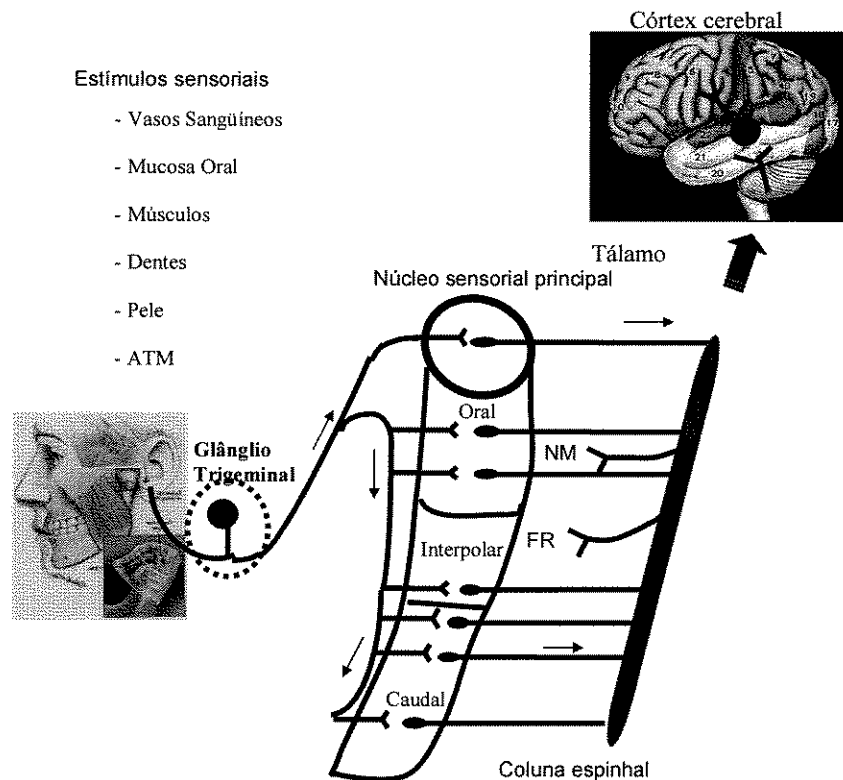


Figura 04. Principal via somatossensorial da boca e face. Os aferentes primários do trigêmeo (V) têm seus corpos celulares no gânglio trigeminal e se projetam para os neurônios de segunda ordem no complexo nuclear sensorial V do tronco encefálico. (NM – núcleo motor; FR – formação reticular. Adaptado de Lund *et al*, 2002).

A maior parte dos dados clínicos (Sessle, 2000) e laboratoriais (Hu *et al*, 1994, 1997; Tsai *et al*, 1999) indica que o núcleo caudal é o principal local de retransmissão de informação nociceptiva trigeminal do tronco encefálico. Por exemplo, a transecção do trato espinhal trigeminal (tratotomia trigeminal) no pólo rostral do subnúcleo caudal para alívio de dor da neuralgia do trigêmeo, produz uma sensível redução na capacidade do paciente em perceber estímulos nocivos, especialmente aqueles aplicados à face (Sessle, 2000).

As lesões do subnúcleo caudal em animais experimentais também interferem nas suas respostas comportamentais nociceptivas desencadeadas por estímulos nocivos nos tecidos periorais e intraorais (Sessle, 1995). Mais ainda, a estrutura laminada e os tipos de células no caudal são semelhantes àsquelas no corno espinhal dorsal, que é a região essencial da coluna espinhal envolvida na

transmissão da dor. Some-se a isso o fato de os aferentes de pequeno diâmetro (fibras A- δ e fibras C), transportando informações nociceptivas de vários tecidos craniofaciais, terminarem predominantemente no caudal, nas suas lâminas I, II, V e VI; em contraste, os aferentes primários fibras A, conduzindo informações mecanossensitivas (táteis) de baixo limiar, terminarem primariamente nos componentes mais rostrais do complexo trigeminal do tronco encefálico e nas lâminas III e VI do caudal. Estudos recentes revelaram aumento de marcadores imunocitoquímicos de atividade neuronal, como as chamadas proteínas Fos, em neurônios caudais após estimulações nocivas de tecidos craniofaciais (Sessle, 2000).

Evidência adicional do papel do subnúcleo caudal nos mecanismos da dor craniofacial tem sido demonstrada pelo registro da atividade elétrica do tronco encefálico, revelando que há muitos neurônios no subnúcleo caudal que são ativados por estímulos cutâneos nociceptivos. Esses neurônios foram classificados em nociceptivo-específico (NE) e de variação dinâmica ampla (VDA) ou multirreceptivo (Lund *et al*, 2002). Os neurônios NE respondem apenas a estímulos nocivos (p. ex., pinçamento, calor), aplicados a um campo receptivo localizado, e recebem estímulos de aferentes de pequeno diâmetro de fibras A δ e/ou fibras C, enquanto neurônios VDA também recebem estímulos de fibras A de grande e pequeno diâmetro que transmitem informações não nocivas (p.ex., táteis). Neurônios VDA possuem um grande campo receptivo com áreas de baixo e alto limiar, enquanto o campo receptivo dos neurônios NE é geralmente menor. Ambos os neurônios, NE e VDA aumentam a sua frequência de disparo à medida que a estimulação nociva é gradualmente aumentada ou quanto mais o campo receptivo é estimulado. Ficou demonstrado que o campo receptivo e as propriedades de resposta dos neurônios nociceptivos do subnúcleo caudal estão associados à nossa habilidade em localizar, detectar e discriminar estímulos nocivos cutâneos (Dubner, 1986, 1995; Sessle, 1995, 2000).

Certamente o subnúcleo caudal, dentre os outros subnúcleos do núcleo do trato espinhal, é o mais estudado. Contudo, recentemente componentes

rostrais do complexo trigeminal, tais como os subnúcleos interpolar e oral, também foram relacionados aos processos nociceptivos (Dallel *et al*, 1990; Sessle, 2000). Lesões dos componentes rostrais, por exemplo, podem interromper alguns comportamentos de dor, e neurônios NE e VDA estão presentes nos componentes rostrais. Esses neurônios têm campos receptivos cutâneos que estão normalmente localizados nas áreas intra-oral e perioral, e muitos deles podem ser ativados por estimulação da polpa dentária.

Sabe-se que após a estimulação nociva periférica há o surgimento da proteína Fos nos neurônios pós-sinápticos do corno dorsal da medula espinhal (Munglani & Hunt, 1995) e no NTE (Hathaway *et al*, 1995). Estudos têm utilizado esse conhecimento para determinar a localização de regiões receptoras de informações nociceptivas, como também para determinar o sítio de ação de drogas. Essa metodologia tem ajudado a reafirmar a importância dos subnúcleos interpolar e oral no processamento de informações nociceptivas, advindas da região orofacial (Figura 05).

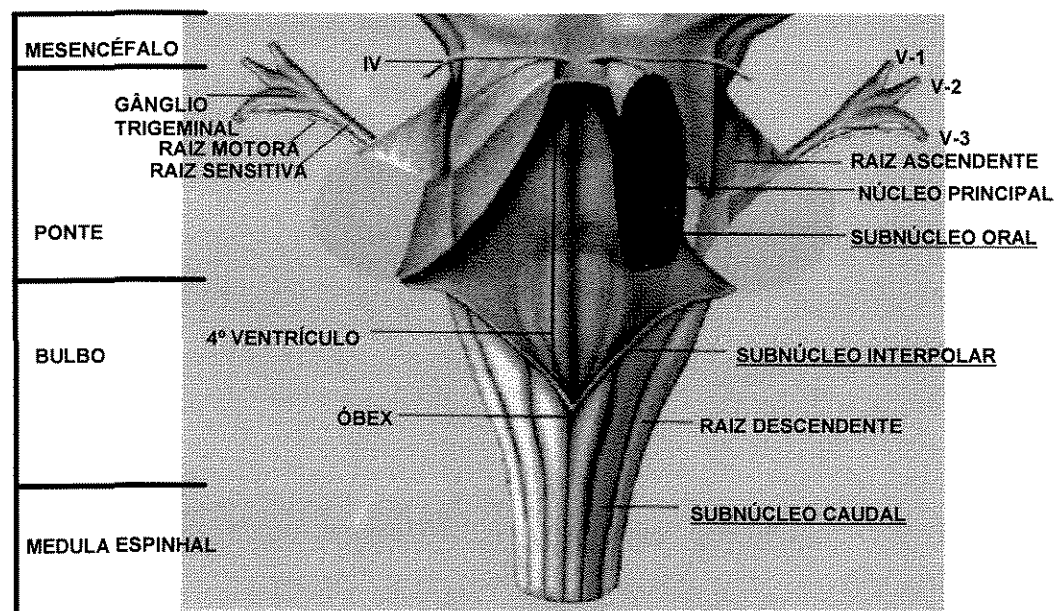


Figura 05. Representação do núcleo do trato espinhal, constituído pelos subnúcleos: oral, interpolar e caudal. Reproduzida de Siqueira & Teixeira, 2001.

No que diz respeito ao subnúcleo interpolar, Hathaway *et al*, 1995, utilizaram a expressão da proteína Fos, após realizar estimulação nociva da ATM de ratos, com o intuito de quantificar o número e a distribuição de grupos de neurônios em diferentes áreas do NTE, encontrando-os na região inferior do subnúcleo interpolar e no subnúcleo caudal, bem como no corno dorsal da medula espinhal cervical superior.

O componente mais rostral do NTE é o subnúcleo oral que tem sido caracterizado em vários trabalhos como sendo essencial para o processamento de impulsos dolorosos originados em tecidos periorais e intraorais (Sessle, 1995). Fundamentos para tal importância podem ser encontrados em estudos anatômicos (Fujiyoshi *et al*, 2000), eletrofisiológicos (Raboisson *et al*, 1995; Dallel *et al*, 1996) e comportamentais (Young & Perryman, 1984; Broton & Rosenfeld, 1986).

Raboisson *et al*, (1995), através de estudos eletrofisiológicos demonstraram que os subnúcleos caudal e oral parecem exercer funções distintas no processamento nociceptivo no complexo trigeminal do tronco cerebral e que o subnúcleo caudal parece estar mais envolvido no processo de dor inflamatória tônica e/ou nos estados hiperalgésicos centrais do que subnúcleo oral.

Os neurônios nociceptivos e os neurônios mecanorreceptores de baixo limiar por todo o complexo trigeminal do tronco encefálico contribuem para as vias somatossensoriais ascendentes para os centros cerebrais superiores, tais como o tálamo (Darian-Smith, 1966; Sessle, 2000). Além disso, há projeções diretas do complexo trigeminal do tronco encefálico para o cerebelo, colículo superior, substância cinzenta periaquedutal, coluna espinhal, formação reticular e núcleo parabraquial pontino (Sessle, 2000).

Depois que os neurônios aferentes primários fazem sinapse no NTE, os interneurônios transmitem os impulsos para os centros superiores. Os interneurônios ascendem por meio de vários tratos passando através de uma região do tronco encefálico chamada *formação reticular* (FR). Nela estão concentrações de células ou núcleos que representam “centros” para várias funções. A FR controla todas as atividades no cérebro intensificando seus

impulsos ou inibindo-os. Esta porção do tronco encefálico tem uma influência extremamente importante na dor e em outros impulsos sensoriais (Okeson, 2000).

Do tronco encefálico a informação nociceptiva proveniente da região orofacial é conduzida ao tálamo e daí ao córtex cerebral (Figura 06).

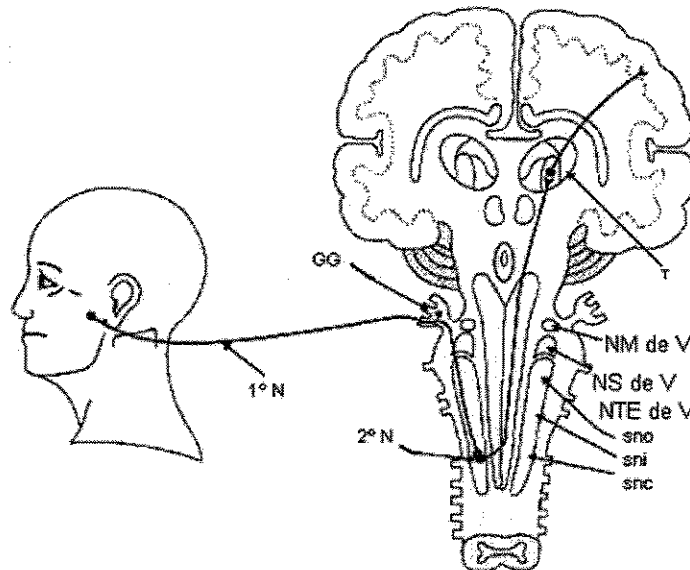


Figura 06. Representação gráfica do nervo trigêmeo (nervo cranial V) entrando no tronco encefálico (TE) ao nível da ponte. O neurônio aferente primário ($1^{\circ}N$) entra no TE para fazer sinapse com um neurônio de segunda ordem ($2^{\circ}N$) no núcleo do trato espinal do trigêmeo (NTE de V). O NTE está dividido em três regiões: o subnúcleo oral (sno), o subnúcleo interpolar (sni) e o subnúcleo caudal (snc). O complexo trigeminal do TE também é composto do núcleo motor do V (NM de V) e do núcleo sensitivo principal do V (NS de V). Os corpos das células do nervo trigêmeo estão localizados no gânglio trigeminal. Uma vez que um neurônio de segunda ordem recebe o impulso, este é conduzido para o tálamo (T) para interpretação. FONTE: Okeson, 2000.

O tálamo está localizado no verdadeiro centro do cérebro. Ele é formado por numerosos núcleos que funcionam em conjunto para interromper impulsos. Conforme os impulsos sobem para o tálamo, ele executa avaliações e dirige os impulsos para regiões apropriadas nos centros superiores para interpretação e resposta (Okeson, 2000). As regiões do tálamo que recebem e retransmitem informações somatossensoriais da região craniofacial são o complexo ventrobasal (ou núcleo ventroposterior), assim como o chamado grupo posterior de núcleos e tálamo medial (Lund *et al*, 2001; 2002). Os neurônios ventrobasais, em sua maior parte, são neurônios mecanorreceptores de baixo limiar

que estão somatotopicamente organizados. Os neurônios que recebem e retransmitem informações táteis da face e da boca concentram-se na porção medial do tálamo ventrobasal (o núcleo ventral póstero-medial), enquanto os neurônios na porção lateral do tálamo ventrobasal retransmitem as informações somatossensoriais do tronco, pescoço e membros. A maior parte dos neurônios mecanorreceptores de baixo limiar no tálamo ventro-basal tem um campo receptivo cutâneo localizável e outras propriedades que permitem uma transmissão confiável de informações detalhadas retransmitidas de receptores periféricos via tronco encefálico. Em contraste, neurônios no grupo posterior e tálamo medial são muito menos específicos na retransmissão de informações (Aghabegi, 1992; Lund *et al*, 2002).

Uma outra estação na qual o estímulo tramita é o hipotálamo (Okeson, 2000), que corresponde ao principal centro do cérebro para controlar a homeostasia orgânica. Quando o hipotálamo é estimulado, ocorre a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, o que aumenta o nível de atividade de muitos órgãos, causando especialmente aumento da frequência cardíaca e vasoconstrição, responsável por grande parte da alteração fisiológica provocada por estímulos dolorosos, o que é de suma importância ser do conhecimento do clínico que deseja tratar a dor orofacial, visto que, estas alterações podem ser causas de emergências médicas no consultório odontológico, como por exemplo hiperventilação e síncope.

Devemos também considerar que os estímulos nociceptivos, antes de chegarem ao córtex sensorial para serem processados, são capazes de estimular o sistema límbico, que é o responsável por alterações comportamentais diante de quadros de dor, reafirmando as consequências multidimensionais da dor no âmbito psicológico.

2.3.1 Sensibilização Periférica

No momento em que ocorre uma lesão tecidual na região orofacial, como por exemplo na ATM, uma série de respostas é imediatamente desencadeada pelo organismo através da liberação de substâncias químicas (prostaglandinas, substância P (SP), íon potássio, bradicinina (BK), ácido láctico, íons hidrogênio, ATP, óxido nítrico (NO) citocinas, fator de crescimento neural, serotonina, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, histamina, etc). Estas substâncias interagem com elementos celulares envolvidos na inflamação (neutrófilos, linfócitos, plasmócitos, macrófagos, fibroblastos, células de Schwann, etc), atraindo-os ou ativando-os, gerando vasodilatação e instalação de processo inflamatório de origem neurogênica (Sedivec, 1983). Isto acarreta alterações neuroplásticas periféricas (Figura 07) e centrais (Dray, 1995; Swift *et al*, 1998).

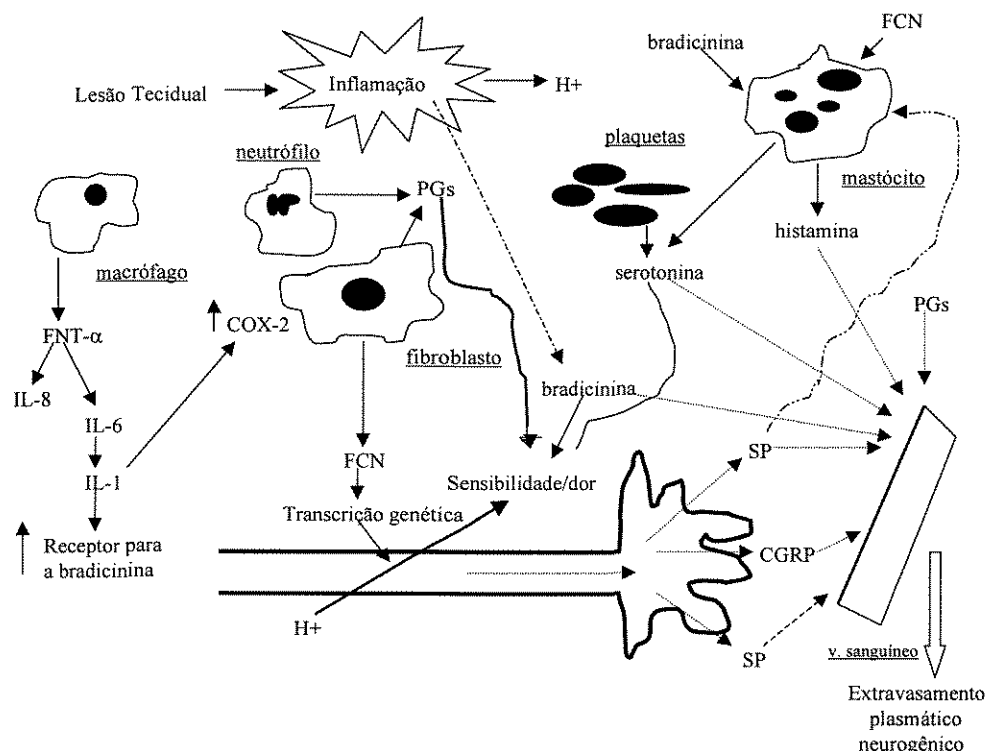


Figura 07 – Mecanismo de sensibilização periférica. Estão resumidas algumas das interações entre os produtos de células imunes, alguns mediadores químicos e fibras sensoriais durante hiperalgesia inflamatória. Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP); ciclooxigenase-2 (COX-2); serotonina (5-HT); interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), interleucinas-8 (IL-8); fator de crescimento neuronal (FCN); prostaglandinas (PGs) e fator de necrose tumoral α (TNF- α). FONTE: Dray, 1995.

Durante o processo de sensibilização periférica, as substâncias químicas liberadas alteram o limiar de excitabilidade dos nociceptores e também são responsáveis pela inflamação de tecidos adjacentes e pela irradiação da dor a partir da área lesionada. Isso pode levar à *hiperalgesia*, definida como aumento na resposta a um estímulo doloroso e à *alodínia*, que corresponde à dor decorrente de um estímulo não nociceptivo (Lund *et al*, 2002). Na prática clínica isso é visualizado em casos, por exemplo, de pulpíte aguda, nos quais um estímulo doloroso pode ser provocado com o simples fato de secar o elemento dental com o jato de ar.

2.3.2 Sensibilização Central

De maneira semelhante à sensibilização periférica, o aumento da liberação dessas substâncias químicas na sinapse entre as fibras periféricas e os neurônios do subnúcleo caudal, ou do corno dorsal da medula espinhal, podem ocasionar um aumento na excitabilidade, no campo receptivo e na atividade espontânea desses neurônios, levando ao processo chamado de sensibilização central (Figura 08) (Sessle, 1995; Woolf, 1996). A sensibilização depende da atuação dos aminoácidos (ácido glutâmico, ácido aspártico) e das taquicininas (SP). Os receptores AMPA (ativados pelo ácido 2-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxasole-propilônico) e os cainato são acionados imediatamente após a liberação de aminoácidos excitatórios e estão envolvidos no mecanismo de localização têmporo-espacial e na quantificação da dor (Collingridge & Singer, 1990). Os receptores NMDA (N-metil-D-aspartato), ativados por aminoácidos e modulados por neuropeptídeos (SP) atuam centenas de milisegundos após a chegada do estímulo. Os receptores de neurocininas ativados pelas neurocininas estão relacionados com o mecanismo da sensibilização dos neurônios da medula espinhal (dor crônica) e com a modulação da nocicepção. Estímulos leves e moderados liberam pequena quantidade de ácido glutâmico e de SP que despolarizam a membrana neuronal e geram sensação dolorosa momentânea. Estímulos intensos e prolongados resultam em deslocamento dos íons Mg^{++} dos

receptores NMDA e em penetração de íons Ca^{++} para o interior do citoplasma. Os íons Ca^{++} extracelulares somam-se aos das reservas intracelulares e ativam sistemas enzimáticos que sintetizam segundos mensageiros, incluindo o AMP-cíclico que causa fosforilação das membranas neuronais que se tornam hiperexcitáveis e neurotransmissores retrógrados (óxido nítrico, prostaglandinas) que, do interior dos neurônios escoam-se para o interstício e acarretam liberação de maior quantidade de neurotransmissores excitatórios dos aferentes primários ou creatinofosfocinase (PKC), que modifica a expressão genética (pró-oncogens), resultando na síntese de RNA mensageiro que induz a produção de receptores excitatórios que se adaptam à superfície neural (regulação ascendente) (Lund *et al*, 2002).

Sensibilização Central

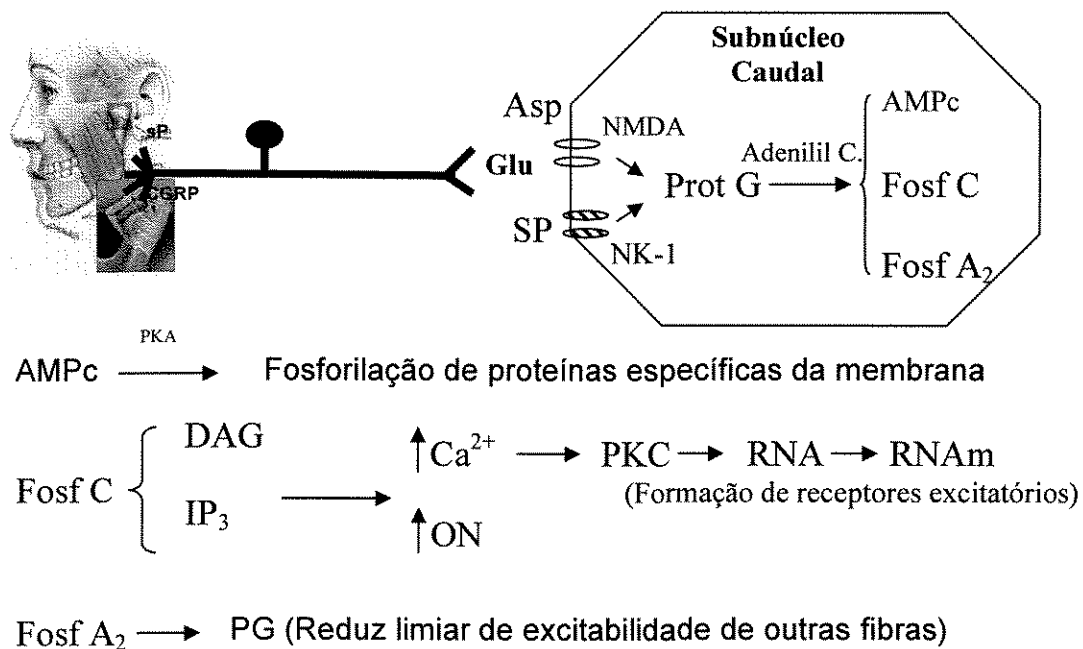


Figura 08 – Mecanismo de sensibilização central. Ácido aspártico (asp), glutamato (glu), substância P (SP); N-metil-D-aspartato (NMDA); creatinofosfocinase (PKC), neuroquinina (NK-1); diacilglicerol (DAG); óxido nítrico (ON), prostaglandina (PG). Fonte: Teixeira: 2000.

A sensibilização dos neurônios do corno posterior da substância cinzenta da medula espinhal (CPME), a ativação das sinapses inativas e o reforço

das sinapses fracas de colaterais de aferentes primários que veiculam informações das áreas vizinhas ou distantes daquelas em que a dor foi originalmente induzida são, entre outras, as causas da hiperalgesia mecânica secundária, da alodínea e da dor referida e difusa, associadas à injúria tecidual ou à inflamação de tecidos profundos (Hu, *et al*, 1994; Teixeira, 2000).

O reconhecimento da complexidade do problema é o primeiro passo para auxiliar pacientes com dores crônicas. O profissional deve realizar uma avaliação das doenças subjacentes, dos tratamentos prévios e seus resultados, da interação estabelecida entre outros profissionais e paciente e do contexto socioeconômico, cultural e familiar em que a dor ocorre. Deve-se estar consciente de que a iatrogênese é uma complicação possível, e profissionais que oferecem apenas “soluções biomédicas” inadvertidamente aumentam os riscos e os problemas. Dualismo cartesiano (mente-corpo) e noções do “corpo como uma máquina” permeiam a cultura da medicina contemporânea e o sistema médico-legal (Kapczinski, 2004). A visão moderna sobre dor crônica enfatiza, no entanto, a necessidade de uma abordagem mais global, que incorpore influências sociais, culturais e psicológicas à dor e ao sofrimento relatado.

Nessa abordagem psicológica, a ansiedade figura como um dos principais fatores a ser considerado, visto que, quando grupos de pacientes com DTMs foram estudados para estados emocionais comuns, a maioria das análises (Solberg *et al*, 1972; Marbach *et al*, 1988; Al Absi and Rokke, 1991; Carlson *et al*, 1993; Arntz *et al*, 1994; Gatchel, 1996) demonstrou que altos níveis de ansiedade parecem ser comuns. Não se determinou se estes níveis altos eram a causa de sintomas ou se a presença dos sintomas é que aumentou estes níveis de ansiedade.

É provável que ambos os fatores existam, contudo a literatura específica não demonstra o quanto os sintomas das DTMs, principalmente a dor, é capaz de alterar os níveis de ansiedade, o que por sua vez intensificaria o quadro

de dor, gerando um ciclo vicioso, cujas conseqüências seriam expressivas ao paciente e devem ser consideradas pelo profissional durante o tratamento de casos de dor secundária às DTMs.

2.4. Ansiedade

2.4.1. Conceito de ansiedade: o Normal e o Patológico

Etimologicamente, a palavra ansiedade provém do termo grego *Anshein*, que significa “estrangular, sufocar, oprimir”. O termo correlato, angústia, origina-se do latim, onde *angor* significa “opressão” ou “falta de ar”, e *angere* quer dizer “causar pânico”. Tais palavras latinas derivam da raiz indo-germânica *Angh*, indicando estreitamento ou constrição. Todos esses termos referem-se, metaforicamente, à experiência subjetiva característica da ansiedade. A distinção entre ansiedade e angústia é feita por alguns autores, porém não há consenso a respeito do assunto.

A ansiedade é um estado emocional subjetivamente vivenciado como desagradável ou ameaçador, que inclui sintomas como alteração do humor e da cognição geralmente acompanhados por alterações comportamentais e fisiológicas, tais como palpitações, sudorese e hipervigilância (Pratt, 1992). Sabe-se que um certo grau de ansiedade é útil para motivar um bom desempenho em tarefas cognitivas (Graeff *et al*, 1997) e, além disso, pode ser uma resposta de alerta eficaz contra uma ameaça ou um estímulo estressante (Pratt, 1992). Contudo, o limite entre o que se denomina ansiedade normal e a patológica é muitas vezes difícil de ser estabelecido.

A ansiedade transforma-se em patológica quando a resposta ao estímulo percebido torna-se exagerada, irracional e disruptiva e, então, interfere na qualidade de vida do indivíduo e na sua capacidade em desempenhar normalmente suas funções (Pratt, 1992; Graeff *et al*, 1993). Esse tipo de

ansiedade muitas vezes é consequência de outras doenças, de natureza psiquiátrica ou não. Trata-se, portanto, de uma ansiedade secundária, mas também pode ser a manifestação principal ou única de um quadro clínico, sendo então denominada ansiedade primária. Como nos demais distúrbios psiquiátricos, a ansiedade patológica parece depender de uma interação entre predisposição e fatores ambientais precipitantes. A predisposição é em parte determinada geneticamente, soma-se a isto a participação de experiências marcantes que o indivíduo tenha sofrido durante a formação da personalidade (Graeff *et al*, 1997).

A ansiedade patológica pode existir em várias condições. Costuma estar presente em condições estressantes variadas, como associada a doenças, na vigência do uso de medicamentos ou drogas, na abstinência de depressores do SNC ou mesmo, primariamente, nos chamados transtornos ansiosos. Entretanto, estes não são os únicos quadros psiquiátricos com níveis patológicos de ansiedade. Por exemplo, alguns autores vêem os transtornos depressivos e ansiosos como parte de um mesmo contínuo, que vai da ansiedade leve à depressão melancólica. Uma evidência a favor desta posição está no efeito terapêutico indiferenciado dos agentes farmacológicos antidepressivos (Graeff *et al*, 1997; Crawley, 1985; Overstreet *et al*, 1995; Gonzales *et al*, 1998) (Tabela 1).

Tabela 1
Classificação dos transtornos de ansiedade segundo o *Diagnostic Statistical Manual*. Fonte: Graeff & Brandão, 1999.

CLASSIFICAÇÃO DOS TRANSTORNOS DE ANSIEDADE

- Transtorno de pânico com agorafobia
 - Transtorno de pânico sem agorafobia
 - Agorafobia sem história de transtorno de pânico
 - Fobia específica
 - Fobia social
 - Transtorno obsessivo-compulsivo
 - Transtorno de estresse pós-compulsivo
 - Transtorno de estresse pós-traumático
 - Transtorno de ansiedade generalizada
 - Transtorno de ansiedade devido a uma condição médica geral
 - Transtorno de ansiedade induzida por substância
 - Transtorno de ansiedade não especificado
-

Também se discute sobre a distinção entre ansiedade e medo. Ambos são semelhantes, porém, enquanto o medo é fruto de ameaça definida, na ansiedade a fonte de perigo é incerta ou desconhecida (Graeff & Brandão, 1999; Graeff & Guimarães, 2001).

A ansiedade e o medo têm suas raízes nas reações de defesa dos animais verificadas em resposta aos perigos comumente encontrados no meio ambiente onde evoluíram. Quando um animal é confrontado com uma ameaça ao seu bem estar, a sua integridade física ou à própria sobrevivência, adota algumas estratégias padronizadas em função de diferentes níveis de ameaça com que se defronta (Graeff *et al*, 1997). São dois os sistemas neurais que medeiam a reação de defesa dos animais: o sistema de inibição comportamental e o sistema cerebral de defesa, acionados em situações de conflito ou de perigo iminente, respectivamente (Graeff, 1994).

O *sistema de inibição comportamental* (SIC) (Figura 09) é constituído pela formação septo-hipocampal, juntamente com estruturas cerebrais relacionadas, dentre as quais incluem-se os córtices pré-frontal e cingulado, tálamo anteroventral e corpos mamilares (Kapczinski, 2004).

Este sistema responde aos eventos punitivos, estímulos novos e frustração condicionada através da supressão do comportamento operante mantido por recompensa ou, então, pela esquiva da punição. A função do sistema septo-hipocampal seria a de comparar a síntese dos dados sensoriais atuais, que o hipocampo recebe do córtex entorrinal, com as previsões geradas no circuito apresentado por James Papez (1937). O autor, reunindo uma base limitada de evidências clínicas e experimentais, propôs que um conjunto interligado de estruturas cerebrais (mais tarde denominado circuito de Papez, em sua homenagem) desempenhava um papel importante na elaboração das emoções. Esse circuito inicia-se no hipocampo, passando pelo corpo mamilar do hipotálamo, tálamo anteroventral, córtex do giro do cíngulo e córtex entorrinal, antes de retornar ao hipocampo. Papez sugeriu que as informações sensoriais que chegam

ao tálamo seguem três rotas distintas. A primeira destina-se ao córtex cerebral, sendo responsável pelo componente cognitivo das emoções. A segunda dirige-se aos núcleos da base, embasando seu componente motor ou comportamental. A terceira, por fim, vai ao corpo mamilar do hipotálamo, elaborando as manifestações neurovegetativas e endócrinas das emoções (Kapczinski, 2004).

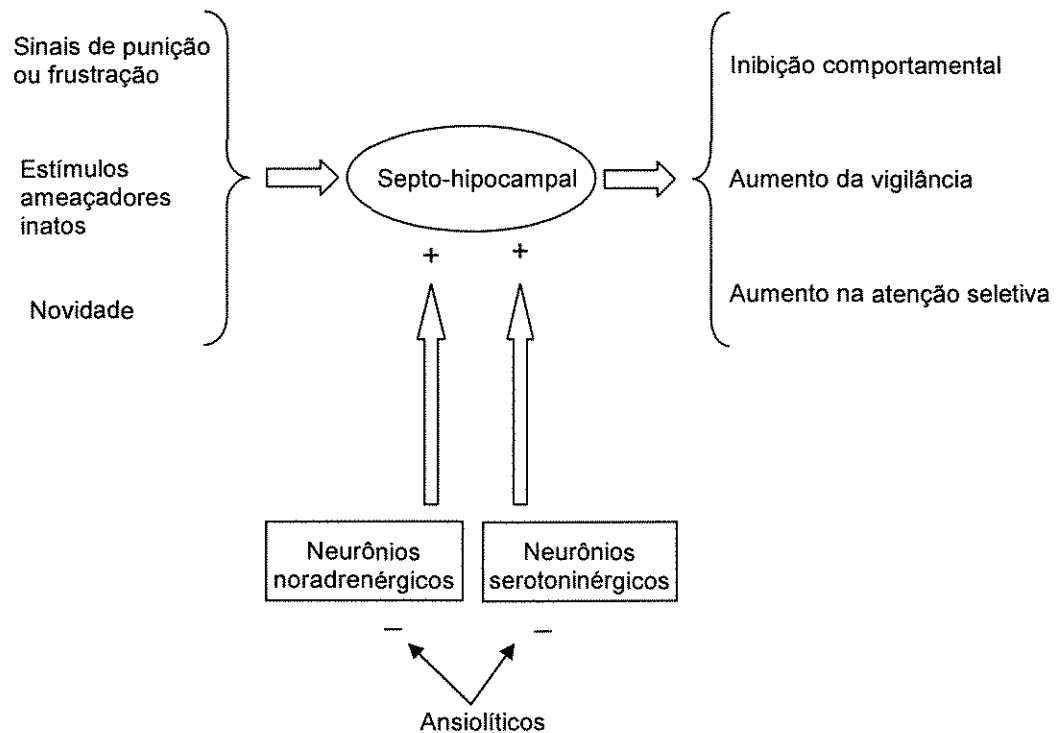


Figura 09. Sistema de inibição comportamental. FONTE: Kapczinski, 2004.

Essas predições levam em conta as memórias armazenadas em diversos locais do SNC, bem como os planos de ação gerados pelo córtex pré-frontal. Quando há coerência entre duas representações, o sistema septo-hipocampal continua a executar a sua tarefa de aferidor. Entretanto, quando detecta uma discrepância entre o esperado e o acontecido, o sistema septo-hipocampal passa a funcionar na modalidade de controle. Neste caso, gera inibição comportamental, aumenta o nível de vigília e dirige a atenção do animal para as possíveis fontes de perigo. Tal estado é identificado como a própria ansiedade.

A ativação do SIC resultaria na inibição de qualquer atividade que o animal esteja exercendo, levando, no extremo, à imobilidade tensa ou congelamento. Essa inibição comportamental é acompanhada de aumento da vigilância e da atenção, esta última voltada para perigos potenciais. O funcionamento do sistema septo hipocampal seria facilitado por aferências nervosas mediadas pelos neurotransmissores noradrenalina e serotonina, provenientes do tronco cerebral, onde atuam os medicamentos ansiolíticos, capazes de reduzir a ansiedade por antagonizar a atividade do SIC (Graeff, 2003; 2004; Kapczinski, 2004).

O *sistema cerebral de defesa* (Figura 10) é representado pelo hipotálamo medial, pela matéria cinzenta periaquedutal dorsal e pela amígdala. Nele processam-se os mecanismos associados à resposta incondicionada. Por exemplo, há evidência de que na amígdala os sinais de perigo ganham um colorido afetivo e são avaliados quanto ao grau de ameaça que representam para o organismo (Graeff, 1994). A estimulação elétrica destas estruturas produz um padrão típico de respostas caracterizado por uma atividade motora intensa acompanhada de saltos, ao lado de reações neurovegetativas como aumento da pressão arterial, da frequência cardíaca, da respiração, piloereção, micção, defecação e exoftalmia (Graeff, 1994). O conjunto de respostas descrito caracteriza o que conhecemos como uma reação de defesa que normalmente acompanha os estados aversivos característicos de medo e ansiedade. Além da matéria cinzenta periaquedutal dorsal, hipotálamo e amígdala, há evidência de que do sistema cerebral de defesa também fazem parte o colículo superior, que processa informações visuais, e o colículo inferior, que é uma plataforma importante das vias auditivas que se projetam para o tálamo e córtex temporal (Brandão, 1995).

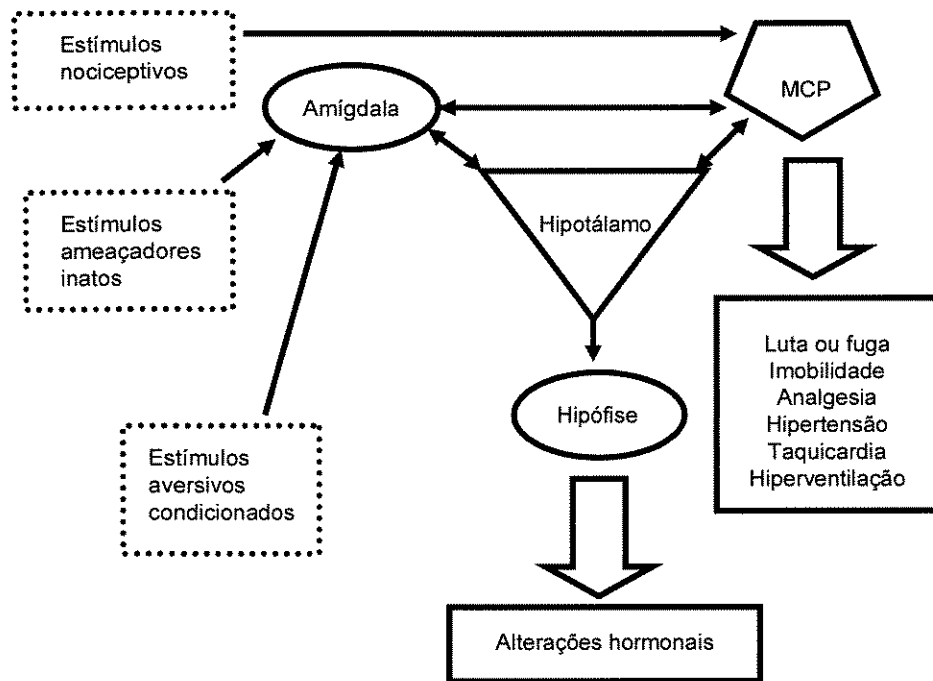


Fig. 10. Diagrama representando o sistema cerebral de defesa. FONTE: Graeff & Guimarães, 2001.

No campo das alterações hormonais, o medo e a ansiedade são condições estressantes e, assim sendo, acompanhados da mobilização do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, denominado por Hans Selye de síndrome de adaptação geral. Portanto, para o estudo experimental, do ponto de vista fisiológico, as alterações produzidas pela mobilização desse eixo podem constituir-se em medidas objetivas de ansiedade (Graeff *et al*, 1997).

2.4.2. Ansiedade e Transmissão Gabaérgica

Vários neurotransmissores têm sido implicados na ansiedade. Dentre eles figuram as aminas biogênicas (noradrenalina, serotonina e dopamina), os aminoácidos (ácido gama-aminobutírico, glicina), os peptídeos (fator liberador de corticotropina, hormônio adrenocorticotrópico, colicistocinina) e os esteróides (corticosterona). No entanto, o ácido gama-aminobutírico (GABA) e a serotonina

(5-HT) são os que estão mais relacionados aos distúrbios de ansiedade, e na ação dos ansiolíticos (Graeff *et al*, 1997; Graeff 2003; 2004).

A participação do GABA na ansiedade foi aventada em consequência do estudo do mecanismo de ação dos benzodiazepínicos (BDZs), que foram introduzidos na prática médica no início da segunda metade do século passado. Os BDZs são eficazes, sobretudo no distúrbio da ansiedade generalizada, possuem baixíssima toxicidade e menor capacidade de produzirem dependência que seus antecessores, os barbitúricos (Graeff *et al*, 1997). Posteriormente à descoberta de que o clordiazepóxido, um composto benzodiazepínico, apresentava propriedades ansiolíticas em animais de laboratório, juntamente com outros efeitos observados em modelos animais de ansiedade, o farmacólogo norte americano Randall sugeriu que esse composto poderia ter potencial terapêutico no homem (Graeff & Brandão, 1999). Esta sugestão foi logo comprovada em ensaios clínicos. Verificou-se, também, que as propriedades farmacológicas do clordiazepóxido eram compartilhadas por uma família de derivados BDZ, dentre os quais destacava-se o diazepam, até hoje um dos compostos mais usados na terapêutica. Os compostos BDZ intensificam as ações do GABA, sabidamente o principal transmissor inibitório do SNC, e modula diversos sistemas funcionais (Figura 11).

Embora os primeiros BDZs conhecidos tenham sido produtos sintéticos, há evidências sugestivas de que possam ser, também, compostos endógenos, que exercem função neuromoduladora no SNC de mamíferos (Medina *et al*, 1993). Compostos com imunorreatividade similar aos BDZs foram identificados em vários alimentos e também podem ser produzidos pela flora bacteriana intestinal. Acrescente-se a isso que a imunorreatividade do tipo BDZs foi encontrada em culturas de neurônios mantidas em meio artificial, indicando que células nervosas são capazes de sintetizar moléculas de BDZs (Kapczinski *et al*, 2004). Como os BDZs são moléculas artificiais, obtidas por síntese química, a presença de receptores no SNC levanta forte suspeita sobre a existência de substâncias elaboradas pelo próprio SNC, que atuem sobre eles para regular estados normais

ou patológicos de ansiedade (Graeff *et al*, 1997). Finalmente, trabalhos neuroquímicos e comportamentais realizados em ratos sugerem um papel funcional para BDZs endógenos na modulação da ansiedade e da memória emocional (Medina *et al*, 1993).

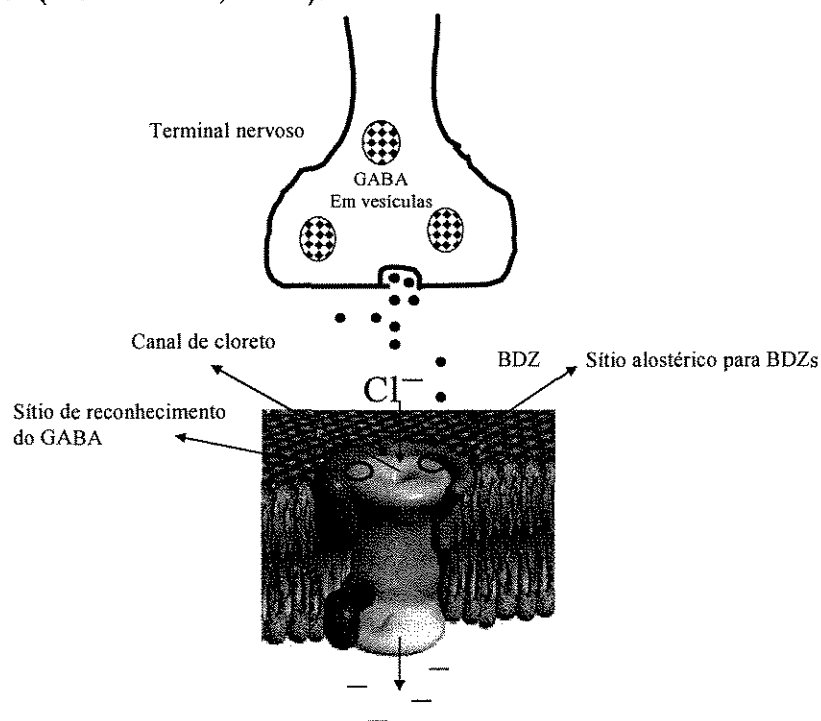


Figura 11 - Representação esquemática da terminação GABAérgica. O sítio de reconhecimento do GABA e dos BDZs estão situados em diferentes subunidades, que interagem entre si por mecanismos alostéricos. Adaptado de: Graeff & Brandão, 1999.

O efeito de compostos BDZs tem sido demonstrado em diferentes modelos animais. Pellow *et al*, (1985), utilizando indicadores tradicionais de ansiedade no labirinto em cruz elevado (LCE), mostraram que esse modelo é bastante sensível à drogas que atuam em receptores GABA/benzodiazepínicos. Drogas ansiolíticas clássicas tais como o diazepam e o clordiazepóxido aumentam a quantidade de entradas e o tempo gasto nos braços abertos do labirinto. Em 1991, Gomita *et al*, demonstraram que estes mesmos fármacos também aumentam o limiar de estimulação da matéria cinzenta periaquedutal dorsal de ratos sem afetar o desempenho motor e que antagonistas GABA (bicuculina e picrotoxina) inibem o aumento do limiar de estimulação produzido pelo diazepam. Adicionalmente, Griebel *et al*, (1995) demonstraram que ligantes BDZs modulam

diferentemente a defesa “antipredador” em camundongos e que essa modulação depende, não só da eficácia intrínseca desses ligantes, mas também das estratégias de defesa exigidas por estímulos ameaçadores.

Traçadas essas considerações sobre dor e ansiedade devemos enfatizar a dificuldade em estudá-las em seres humanos, devido a uma série de fatores que envolvem desde aspectos sócio-culturais, familiares, étnicos, experiências passadas, a aspectos psicológicos capazes de influenciar copiosamente os resultados. Portanto, o desenvolvimento e a utilização de modelos animais são imprescindíveis para elucidar os mecanismos fisiológicos envolvidos nestes processos.

2.5. Modelos Animais

Modelos animais simulam algumas das características elementares de um estado patológico específico, favorecendo a compreensão da patologia e o desenvolvimento de terapias eficazes. Fornecem uma aproximação simplificada aos complexos fatores relacionados à patologia. O uso de modelos animais oferece diversas vantagens distintas: primeiro, eles simplificam o sistema estudado; segundo reduzem o número de variáveis cujo controle é inacessível, oferecendo maior grau de controle experimental e, finalmente, permitem manipulações experimentais que poderiam ser impossíveis em outras circunstâncias (Thrane *et al*, 1996).

2.5.1 Modelos animais de dor

A compreensão atual dos diferentes mecanismos que envolvem e influenciam o processamento do estímulo doloroso, apenas se tornou possível devido ao desenvolvimento de modelos experimentais, tanto em humanos quanto em animais, nas diversas áreas de interesse do estudo da dor.

Estudar dor a partir de sua indução envolve problemas éticos tanto no que se refere a seres humanos quanto a animais. Contudo, o estudo em modelos animais é preferível, considerando que muitas variáveis que poderiam influenciar na quantificação da dor podem ser excluídas, entre elas figuram as experiências passadas, os fatores sócio-econômicos e os fatores culturais.

Na área odontológica, principalmente através de modelos experimentais em animais, tem-se conseguido, cada vez mais, obter informações acerca dos mecanismos neurofisiológicos que medeiam a dor orofacial.

A literatura apresenta uma série de técnicas para a aquisição de informações sobre a dor na região orofacial. Entre elas estão técnicas eletromiográficas, eletrofisiológicas e comportamentais. O estudo da dor por essas técnicas é realizado após sua indução. Isso pode ser conseguido através da administração de diferentes agentes irritantes em cobaias. Dentre esses agentes destacam-se: carragenina, óleo de mostarda, ácido acético, levedura, serotonina, fator de ativação plaquetária, caulim, formalina, entre outros (Wheeler-Aceto *et al*, 1990; Donnerer *et al*, 1991). Destes, o teste da formalina tem se mostrado um método confiável para avaliar dor em várias partes do corpo e tem sido utilizado com sucesso em muitos estudos (Clavelou *et al*, 1989; Cadet *et al*, 1993; Clavelou *et al*, 1995; Roveroni *et al*, 2001).

2.5.1.a. Teste da Formalina

A maioria dos estímulos nociceptivos comumente utilizados em experimentos comportamentais em animais para o estudo da dor orofacial, como é o caso da estimulação elétrica ou mecânica da polpa dental (Young *et al*, 1984), requerem que os animais fiquem mais ou menos contidos durante o período de teste, e sabe-se que o estresse causado por esse tipo de restrição pode alterar a sensibilidade à dor (Dubuisson & Dennis, 1977).

Outra maneira de se induzir dor para seu estudo é através da injeção de substâncias nociceptivas, como já mencionado (Wheeler-Aceto *et al*, 1990).

Para o estudo das vias nociceptivas em diferentes regiões do corpo de ratos e camundongos, têm-se utilizado amplamente o teste da formalina. O teste é considerado um modelo de dor inflamatória tônica e sensível a várias classes de drogas analgésicas (Hunskaar & Hole, 1987; Tjolsen *et al*, 1992).

Esse teste foi originalmente descrito por Dubuisson & Dennis (1977), para uso em ratos e gatos. Os autores descreveram pela primeira vez o modelo comportamental, partindo da resposta ao estímulo nocivo induzido pela administração cutânea de formaldeído a 37% diluído em solução salina (formalina) no dorso da pata traseira de ratos. Os comportamentos nociceptivos estereotipados, caracterizados pelos atos de lambear e levantar rapidamente a pata na qual o agente tinha sido aplicado, eram percebidos.

Observou-se que a injeção de formalina na pata produzia uma resposta comportamental de padrão bifásico (Dubuisson & Dennis, 1977; Rosland *et al*., 1990; Wheeler-Aceto & Cowan, 1991; Coderre *et al*, 1993; Teng & Abbott, 1998), uma fase inicial de dor intensa e de curta duração (primeiros 5 minutos), possivelmente causada por efeito direto da formalina sobre receptores sensoriais (Dubuisson & Dennis, 1977; Hunskaar *et al*, 1985; Hunskaar & Hole, 1987) e uma segunda fase de dor moderada e persistente (entre 10 a 60 minutos após a injeção) que poderia ser provocada por impulsos aferentes induzidos pela inflamação local. Entre a primeira e a segunda fase ocorre um curto período de latência, denominado de interfase (Henry *et al*, 1999). Alguns autores afirmam que esse período de baixa atividade comportamental é atribuído à redução momentânea da atividade das fibras nervosas aferentes (Puig & Sorkin, 1996; McCall *et al*, 1996) ou ainda à ação de mecanismos inibitórios descendentes (Franklin & Abbott, 1993).

Contudo, estudos comprovando que mediadores endógenos, como a bradicinina, a serotonina, a histamina e a substância P, participam da primeira fase (Shibata *et al*, 1989; Correa & Calixto, 1993; Parada *et al*, 2001), levantaram

a possibilidade dessas teorias não serem completamente verdadeiras. Também tem sido aventada a possibilidade de a segunda fase estar relacionada com o processo inflamatório e depender de alterações no SNC, provocadas pela atividade neural ocorrida durante a primeira fase (Coderre *et al*, 1990; Tjolsen *et al*, 1992), como resultado do processo de sensibilização central.

Entretanto, a sensibilização central induzida pela primeira fase da formalina, pode não ser suficiente para manter as respostas comportamentais nociceptivas durante a segunda fase. Isso pôde ser comprovado através de um experimento no qual foi realizada a administração local de um derivado quaternário da lidocaína hidrofílica (QX-314) 10 minutos após a injeção de formalina na pata, o que foi capaz de inibir as respostas da segunda fase, sugerindo, portanto, a participação do componente periférico (Taylor *et al*, 1995; Dallel *et al*, 1995). Trabalhos sugerem o envolvimento da histamina e da serotonina na segunda fase do teste da formalina injetada na pata de ratos, isso demonstra a importância do componente periférico nessa segunda fase (Parada *et al*, 2001).

Clavelou *et al*, (1989) adaptaram o teste da formalina para que fosse possível o estudo da dor na região orofacial. Eles observaram que a injeção de formalina no lábio superior de ratos era capaz de induzir comportamento nociceptivo caracterizado pelo ato de coçar a região orofacial com as patas dianteiras (ambas as patas) e algumas vezes com a pata traseira ipsilateral. Assim como observado no modelo original, houve o mesmo padrão bifásico, fase inicial (3 primeiros minutos) e fase tardia (entre 18 a 42 minutos após a injeção).

Considerando que, estudos epidemiológicos demonstram que as principais fontes causadoras de dor na região orofacial são alterações nos tecidos profundos, como o articular e o muscular, Roveroni *et al* (2001) desenvolveram um modelo comportamental através da administração de formalina na região da ATM de ratos. A administração de formalina na ATM de ratos desencadeia os

comportamentos nociceptivos de coçar a região orofacial, de levantar rapidamente a cabeça e o de tombar a cabeça para o lado tratado.

Os autores testaram diferentes concentrações de formalina (0,5%, 1,5%, 2,5% e 5,0%) e os resultados mostraram que as respostas comportamentais foram significativamente maiores a partir de 1,5% e que acima disso, as respostas não diferiram entre si.

As respostas comportamentais nociceptivas caracterizadas pela exacerbação do ato de coçar a região orofacial e pelo ato de levantar rapidamente a cabeça podem ser utilizadas como índice de dor orofacial para o teste da formalina na ATM de ratos, sejam avaliadas separadamente ou em conjunto, pela soma das mesmas (Roveroni *et al*, 2001). Assim como descrito na literatura, a simples soma de mais de um comportamento seria a forma mais adequada de avaliar as respostas comportamentais induzidas pela administração de formalina, uma vez que pode haver uma integração entre os comportamentos (Wheeler-Aceto & Cowan, 1993; Abbott *et al*, 1995).

Apesar dos testes da formalina na pata e no lábio apresentarem um padrão bifásico, o teste da formalina na ATM apresenta uma única fase de resposta, devido à necessidade, mesmo que momentaneamente, de anestésiar o animal com o halotano para a injeção. O fato de anestésiar o animal justifica-se devido à dificuldade de acesso ao local (ATM), além disso, eticamente é um procedimento mais aceitável.

2.5.2 Modelos animais de ansiedade

Como visto anteriormente, parece provável que as bases neurais da ansiedade se sobrepõem aos circuitos neurais do medo (Graeff, 1993; 1994). Modelos animais de ansiedade podem ser úteis para garantir mais objetividade ao estudo desses estados já que eles permitem evitar o viés do comportamento verbal e os efeitos das contingências culturais. Empregando-se modelos animais é

possível reproduzir os aspectos da sintomatologia, etiologia, ou de possíveis tratamentos para a ansiedade, assim como identificar compostos ansiolíticos e seus mecanismos de ação (File, 1992; Treit, 1985). Contudo, uma validação desses modelos no laboratório inclui a presença de correlação, homologia e isomorfismo em relação ao que se obtém na clínica (Treit, 1985). A validação de um modelo deve necessariamente envolver uma demonstração da sensibilidade do mesmo a drogas de perfil ansiolítico na clínica (File & Pellow, 1985; File *et al*, 1987). De modo geral, os modelos animais de ansiedade são divididos em dois grupos, os fundamentados na aprendizagem associativa (Davis *et al*, 1988; Méthot & Deutsch, 1984) e os etologicamente fundamentados (Crawley, 1981; Carden & Hofer, 1991; Winslow & Insel, 1991; Lister, 1987; Moser, 1989; Handley & Mithani, 1984; Pellow *et al*, 1985; Pellow *et al*, 1987; Treit *et al*, 1993; File *et al*, 1992; Cruz *et al*, 1994).

Entre os modelos baseados na aprendizagem associativa estão o da resposta emocional condicionada (Méthot & Deutsch, 1984), o da resposta de sobressalto intensificado pelo medo (Davis, 1988) e o teste de conflito do beber punido (Vogel, 1971). Com relação aos modelos etologicamente fundamentados estão os da transição do claro para o escuro (Crawley, 1981), interação social (File & Hyde, 1978), vocalização induzida pela separação (Carden & Hofer, 1991; Winslow & Insel, 1991) e labirinto em cruz elevado (Handley & Mithani, 1984; Pellow *et al*, 1985; Lister, 1987; Pellow *et al*, 1987; Treit *et al*, 1993; File *et al*, 1992; Cruz *et al*, 1994).

Até muito recentemente, o valor destes testes dependia da capacidade de detectarem efeitos ansiolíticos de BDZs. Infelizmente, os modelos que detectam com sucesso esses efeitos muitas vezes falham ao detectar a ação ansiolítica de outros tipos de drogas (Winslow & Insel, 1991).

2.5.2.a. Labirinto em Cruz Elevado

O labirinto em cruz elevado (LCE) é um modelo inspirado em um relato de Montgomery (1955), que originalmente usou um labirinto em Y elevado e

demonstrou que ratos exploravam mais o braço fechado. Em 1984, Handley & Mithani usaram pela primeira vez um LCE, com resultados semelhantes.

O LCE é um aparato constituído de dois braços abertos e dois braços fechados por paredes altas e sua funcionalidade como um modelo animal de ansiedade baseia-se na atividade exploratória espontânea e na aversão natural do animal pelos braços abertos (Figura 15). Para ratos, ficar nos braços abertos causa medo ou ansiedade. A passagem forçada ou voluntária pelos braços abertos do LCE está associada com o aumento da concentração plasmática de corticosterona, ao comportamento de congelamento (*freezing*), à emissão de bolos fecais (Pellow *et al*, 1985) e à mudanças comportamentais e hormonais que são indicativas de aumento da ansiedade. Nesse relato, Pellow *et al*, (1985) validaram o procedimento do ponto de vista comportamental, fisiológico e farmacológico, mostrando ser o mesmo uma ferramenta útil para mensurar ansiedade no rato. O modelo pode ser visto também como um teste de conflito (como interpretava Montgomery, 1955), e em ambos os casos apresenta as vantagens de não necessitar de manipulações do comportamento apetitivo além de não envolver qualquer treinamento ou apresentação programada de estímulos nocivos ao animal.

O comportamento exploratório normal de ratos favorece a exploração de braços fechados. Treit *et al*, (1993) afirmaram que embora os animais sejam capazes de discriminar a altura dos braços abertos do LCE, este claramente não é o fator que os leva a evitar este tipo de braço. A aversão pelos braços abertos parece ser motivada pela impossibilidade do animal executar o padrão comportamental de tigmotatismo, uma resposta de defesa natural do animal que os leva a permanecer próximo às superfícies verticais ou em contato com elas, evitando desta forma serem vistos pelo predador (Treit & Fundytus, 1989). Em outras palavras, os espaços abertos se constituem em estímulo aversivo para os ratos.

A tendência a permanecer nos braços fechados do labirinto é aumentada por compostos ansiogênicos, os quais aumentam a aversão aos

braços abertos (Handley & Mithani, 1984; Lister, 1987; Pellow *et al*, 1985). Ao contrário, a administração de compostos ansiolíticos reduz a aversão natural aos braços abertos e favorece a exploração dos mesmos (Pellow *et al*, 1985; Dawson *et al*, 1995). As medidas críticas consideradas relacionadas à ansiedade são as entradas nos braços abertos e o tempo gasto neles (Pellow *et al*, 1985; File, 1992). Já a frequência de entradas nos braços fechados seria um indicador da atividade motora geral (File *et al*, 1992). Entretanto, o tempo gasto nos braços fechados não reflete a atividade geral, mas ansiedade, da mesma forma que as medidas nos braços abertos (File *et al*, 1992; Cruz *et al*, 1994). Isso é esperado, já que o animal tem apenas duas opções, permanecer nos braços abertos ou fechados, e as duas medidas de tempo são imagem de espelho uma da outra.

Embora os compostos que atuam no receptor GABA/benzodiazepina produzam dados consistentes e reproduzíveis, este não é o caso dos demais compostos ansiolíticos e ansiogênicos, putativos ou não (Hogg, 1996). Compostos que atuam na neurotransmissão serotoninérgica, nem sempre promovem efeitos ansiolíticos neste teste, sendo esta uma crítica ao LCE (Moser, 1989; Pellow *et al*, 1985; Cruz *et al*, 1994). Diferenças experimentais poderiam ser invocadas para explicar as discrepâncias encontradas com o uso do LCE. Nesse sentido, em uma revisão sobre a validade e variabilidade deste teste como um modelo animal de ansiedade, Hogg (1996) mostrou que não há uma fórmula mágica no uso do labirinto, mas a construção desse modelo parece ser criticamente importante. Por exemplo, adicionar bordas rasas ao redor dos braços abertos influencia o componente de ansiedade ao qual o aparato é sensível. Fernandes & File (1996) realizaram um experimento no qual ratos foram testados no LCE, com ou sem bordas pequenas sobre os braços abertos, após a injeção de veículo ou clordiazepóxido. Registraram o comportamento desses animais em uma primeira e segunda exposição ao labirinto e confirmaram que as bordas produziam um efeito diferente quando ratos eram testados repetidamente no labirinto. O clordiazepóxido produziu um efeito ansiolítico significativo no primeiro treino somente no labirinto sem bordas, enquanto no segundo treino o efeito foi

observado somente no labirinto com bordas. Então, a presença de bordas alterou a sensibilidade ansiolítica sobre o primeiro e o segundo treino, revelando a enorme complexidade do LCE e a importância dos detalhes na construção do mesmo.

Hogg (1996) ainda ressaltou que o comportamento de roedores nesse modelo é também afetado pelo uso de diferentes linhagens, embora os resultados farmacológicos sejam mais evidentes em resposta a diferenças induzidas experimentalmente. A predisposição dos animais para serem ansiosos e a interação com o medo induzido pelo labirinto não somente determina o resultado de manipulações farmacológicas, mas pode fornecer uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na mediação da ansiedade.

3. PROPOSIÇÃO

3.1. Avaliar o efeito da nocicepção induzida por injeção de formalina 1% em tecido superficial (lábio) e profundo (ATM) sobre o nível de ansiedade de ratos.

3.2. Analisar o efeito do diazepam nas possíveis alterações do nível de ansiedade em resposta à nocicepção orofacial.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar, com 2 meses de idade, padrão sanitário SPF ("specific pathogen free"), fornecidos pelo Centro Multidisciplinar de Bioterismo da UNICAMP. Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, por no mínimo 1 mês, em número de 5 por gaiola contendo maravalha, em sala climatizada ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), em ciclo claro/escuro de 12 h, com alimentação e água à vontade (Rosland, 1991). No dia anterior ao teste, os animais eram pesados para o cálculo da dose dos fármacos utilizados.

Cada animal foi submetido uma única vez aos testes. Os procedimentos experimentais foram realizados no período da manhã, entre 7h e 11h30.

Todos os procedimentos experimentais foram analisados e aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Biologia da Universidade de Campinas, protocolo número 392-1 (**ANEXO 1**).

4.2. Delineamento Experimental

4.2.1. Experimento 01 – Avaliação dos grupos controles

Para avaliar o efeito da anestesia por halotano, considerando o fato de que a administração de substâncias na região periarticular dos animais requer que este esteja anestesiado, bem como para avaliar se o trauma físico provocado pela inserção da agulha na região da ATM poderiam por si só afetar os parâmetros analisados pelo teste do labirinto em cruz elevado (LCE), foram realizados 3 grupos experimentais (n=10-15). Um grupo controle (GC), não submetido a nenhum tratamento prévio, um grupo controle anestesia submetido

somente à anestesia com halotano (GCA) e um grupo controle agulha (GAg), cujos animais após serem anestesiados com halotano, receberam apenas a introdução da agulha na região periarticular sem a injeção de nenhuma substância (Tabela 2).

Tabela 2

Grupos experimentais para estudo dos parâmetros analisados pelo LCE sob influência da anestesia com halotano e do trauma físico induzido pela injeção da agulha na região da ATM.

Grupos	n
Controle (GC)	15
Controle anestesia (GCA)	15
Controle anestesia + agulha (GAg)	14

4.2.2. Experimento 02 – Avaliação da influência da nocicepção na região orofacial sobre o nível de ansiedade em ratos.

Para avaliar o efeito da nocicepção na região orofacial sobre o nível de ansiedade dos animais, foram analisados cinco grupo experimentais (n=10-15), como indicado na tabela 3. Em vista dos resultados obtidos no experimento 01, que serão demonstrados e avaliados na sequência, o grupo utilizado como controle foi o GCA (*).

Tabela 3

Grupos experimentais para estudo da ansiedade provocada pela nocicepção em tecido orofacial superficial e profundo.

Grupos	n
Controle anestesia (GCA) (*)	15
Salina – lábio (SL)	15
Salina – ATM (SATM)	15
Formalina – lábio (FL)	15
Formalina – ATM (FATM)	12

4.2.3. Experimento 03 – Validação farmacológica

Para validação farmacológica dos resultados nas alterações comportamentais observadas nos experimentos anteriores, foram analisados outros grupos experimentais, como está indicado na tabela 4.

Tabela 4

Grupos experimentais para avaliação do efeito do diazepam e do veículo (propilenoglicol) sobre o nível de ansiedade, após a administração de formalina na região orofacial.

Grupos	n
Formalina lábio + diazepam i.p. (FLD)	15
Formalina lábio + veículo i.p. (FLP)	12
Formalina ATM + diazepam i.p. (FATMD)	11

4.3. Procedimentos experimentais

4.3.1. Administração do agente algésico

A cada dia de experimento foi analisado um total de 05 animais, no período entre 7h e 11h30. Os animais eram levados para o laboratório de pesquisa na mesma gaiola em que foram mantidos no biotério. Após 30 min de permanência no laboratório para eliminação do estresse causado pelo transporte, os animais foram individualmente colocados na câmara anestésica e submetidos à anestesia geral superficial por inalação de vapor de halotano, por aproximadamente 40s.

Imediatamente após a verificação de que o animal encontrava-se anestesiado, ele recebeu uma injeção s.c. ou intra-articular de solução salina ou formalina 1% no lábio e/ou na ATM, de acordo com o grupo experimental (tabela 3). Para a injeção, independente se realizada no lábio ou na ATM, foi utilizada agulha calibre 30 acoplada a uma microseringa Hamilton (50 µL) por intermédio de uma cânula de polietileno PE50.

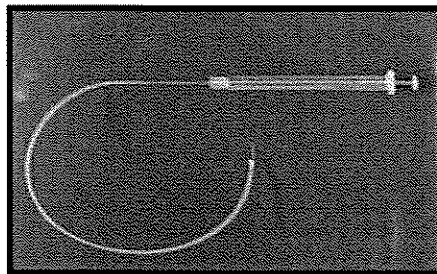


Figura 12 - Agulha calibre 30 acoplada a uma microseringa Hamilton (50 µL) por intermédio de uma cânula de polietileno PE50.

Para a injeção de substâncias no lábio seguiu-se a técnica proposta por Clavelou *et al*, (1995). Os animais receberam uma injeção s.c. de 50 µL de formalina 1% diluída em salina ou o mesmo volume de salina (controle) no lábio superior direito, lateralmente ao nariz (Figura 13).

Para a administração do agente algésico na ATM esquerda de ratos (Hass *et al*, 1992), a borda pósterio-inferior do arco zigomático foi palpada e a agulha inserida imediatamente inferior a este ponto e avançada em uma direção anterior até contatar a parede pósterio-lateral do côndilo, numa profundidade de aproximadamente 3 mm (Figura 14).



Figura 13 - Administração do agente algésico no lábio.



Figura 14 – Administração do agente algésico na ATM.

Após a administração do agente algésico, os animais foram transportados a outro laboratório (adjacente à sala de estudo do comportamento), e 30 min após a injeção, foram submetidos ao teste do LCE durante 5 min, para

avaliação do nível de ansiedade. Este teste comportamental foi realizado entre 8h30 e 11h30.

4.3.2. Administração do agente ansiolítico

Em outro experimento, para validação farmacológica dos resultados comportamentais, foi avaliado o efeito de uma droga ansiolítica, o Diazepam (1,0 mg/Kg), injetado via intra-peritoneal imediatamente após a injeção de formalina na região orofacial (ATM ou lábio) ou o veículo como controle (Fernández-Guasti & Picazo, 1990), conforme indicado na tabela 4.

4.3.3. Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

O teste comportamental foi realizado em uma sala iluminada com luz amarela mimetizando o período claro do dia. O labirinto, construído em madeira, apresenta uma altura de 50 cm, e dois braços abertos e opostos (50x10cm), cruzados em um ângulo reto por dois braços de mesma dimensão fechados por paredes de 40cm de altura, mas com a porção superior aberta. Uma borda de acrílico, com altura de 1cm, envolve os braços abertos para evitar a queda dos animais (Figura 15).

Trinta minutos após a injeção da formalina ou salina na ATM ou lábio e da injeção de diazepam (ou veículo), conforme os grupos experimentais, os animais foram colocados no centro do labirinto, de frente para um dos braços fechados, e observados durante 5 minutos (Pellow *et al*, 1985). Cada animal foi submetido somente uma vez a este teste comportamental. O comportamento de cada animal foi filmado e, posteriormente, as fitas foram analisadas. O analisador não sabia a que tipo de tratamento o animal tinha sido submetido, sendo, portanto um experimento cego. Foram registrados o tempo de exploração dos braços abertos, a porcentagem de entradas nos braços abertos e o número de entradas

nos braços fechados. Uma entrada era considerada quando o animal colocasse as quatro patas em um braço aberto ou fechado (Pellow *et al*, 1985; Cruz *et al*, 1994).

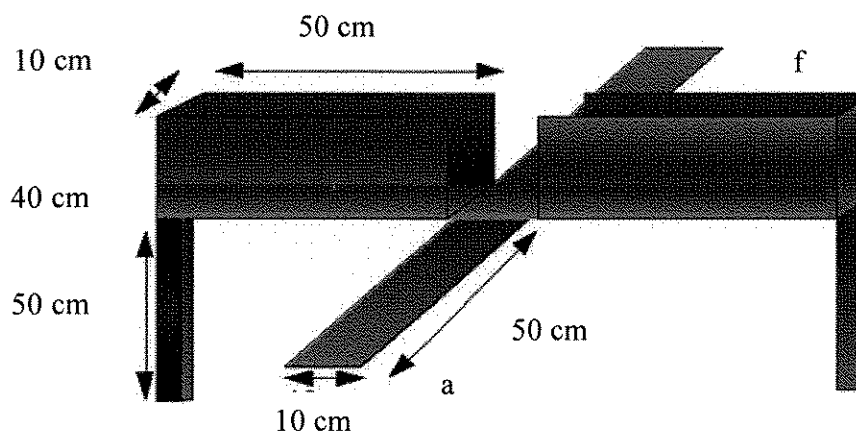


Figura 15. Labirinto em Cruz Elevado. Braços abertos, sem paredes verticais (a) e braços fechados, com paredes verticais (f).

Os resultados foram convertidos posteriormente em:

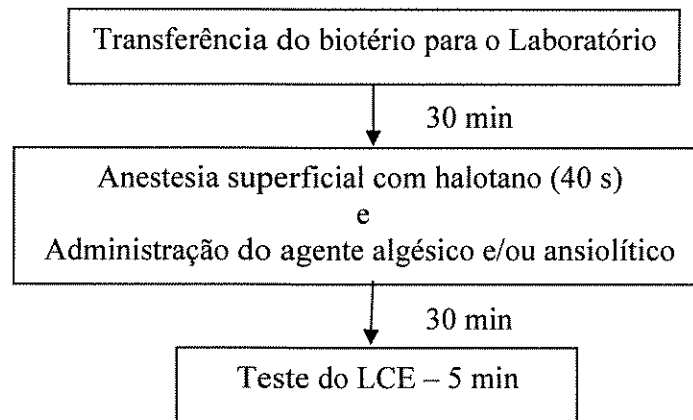
- 1) Porcentagem de tempo de exploração dos braços abertos (%TBA) $(100 \times \text{tempo (s) nos braços abertos} / \text{tempo total de observação})$.
- 2) Porcentagem de entradas feitas nos braços abertos (%EBA) $(100 \times \text{Nº de entradas nos braços abertos} / \text{Nº total de entradas})$.
- 3) Nº de entradas feitas nos braços fechados (NEBF).

A porcentagem de tempo de exploração dos braços abertos é considerada um índice de medo e ansiedade, quanto maior a %TBA menor a ansiedade e vice-versa. A porcentagem de entradas nos braços abertos está relacionada tanto à atividade locomotora quanto à ansiedade (Cruz *et al*, 1994). Por outro lado, o número de entradas nos braços fechados corresponde a um índice de atividade locomotora (Pellow *et al*, 1985; Cruz *et al*, 1994).

Depois de realizado o teste do LCE, todos os animais foram sacrificados por uma sobredose de anestésico. Contudo, para comprovar a correta injeção na região da ATM os animais do grupo que receberam injeção de

qualquer agente (salina ou formalina) na ATM, antes de serem mortos foram anestesiados e receberam uma injeção intra-cardíaca de Azul de Evans 1% (Fiorentino *et al*, 1999). Considerando que este tem a propriedade de se ligar às proteínas plasmáticas extravasadas durante o processo inflamatório agudo, como o induzido pela formalina, comprovava-se a correta injeção na região peri-articular, pela análise visual da coloração do tecido periarticular.

O diagrama abaixo demonstra a seqüência e o tempo determinado para cada passo experimental:



4.4. Soluções utilizadas

- Formalina 1,0% (Hunskar & Hole, 1987; Clavelou, *et al* 1995), sempre preparada imediatamente antes do início do experimento e consistiu da diluição de formaldeído 37% em NaCl 0,9%.
- Solução de cloreto de sódio (NaCl 0,9%) - HALEXISTAR®.
- Formaldeído a 37% (SIGMA-F-1635) ®.
- Halotano (CRISTÁLIA) ®

- Azul de Evans (Sigma Chemical Co®; St Louis, MO – USA) dissolvido em NaCl a 0,9%, preparado numa concentração de 1% e administrado na dose de 30mg/Kg).
- Diazepam (1,0 mg/Kg) (ROCHE) ® diluído em propileno glicol 40%.
- Propileno glicol 40%.

4.5. Análise estatística

Para a análise dos dados do experimento 1 foi utilizado análise de variância seguida pelo teste de Tukey. Para os dados dos experimentos 2 e 3 foi utilizada a análise de variância para delineamento inteiramente casualizado com arranjo fatorial de *Local X Tratamento*, com testemunha (controle anestesia). Comparações múltiplas foram feitas pelo teste de Tukey e para todos os experimentos analisados o nível de significância foi de 5%. Os programas utilizados para a realização dos cálculos estatísticos foram: MINITAB, ESTAT e SISVAR.

5. RESULTADOS

5.1 – Efeito da anestesia com halotano e da inserção da agulha sobre a atividade locomotora e ansiedade dos animais.

A Análise de Variância seguida pelo Teste de Tukey ao nível de significância de 5% entre os grupos controle (GC), controle anestesia (GCA) e controle agulha (GAg) demonstrou que não houve diferença estatisticamente significativa, quanto à porcentagem de tempo de exploração dos braços abertos do LCE.

Com relação à porcentagem de entradas nos braços abertos, também não houve uma diferença estatisticamente significativa entre os 03 grupos controle.

A análise dos dados correspondentes ao número de entradas nos braços fechados, não demonstrou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos controle (GC), controle anestesia (GCA) e controle agulha (GAg).

Os resultados correspondentes aos grupos GC, GCA e GAG estão ilustrados na Tabela 05 e Figura 16.

Tabela 5

Valores médios da Porcentagem de Tempo de Exploração dos Braços Abertos (%TBA), Porcentagem de Entradas nos Braços Abertos (%EBA) e Número de Entradas nos Braços Fechados (NEBF) dos grupos controle (GC), controle anestesia (GCA) e agulha (GAg), submetidos ao teste do LCE. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão.

ANÁLISES	GC (15)	GCA (15)	GAg (14)
%TBA	8,297 $\pm$ 2,207	8,222 $\pm$ 2,693	2,707 $\pm$ 1,198
%EBA	21,27 $\pm$ 3,98	21,25 $\pm$ 5,436	7,464 $\pm$ 3,002
NEBF	7,467 $\pm$ 0,6084	6,067 $\pm$ 0,8365	4,571 $\pm$ 0,8302

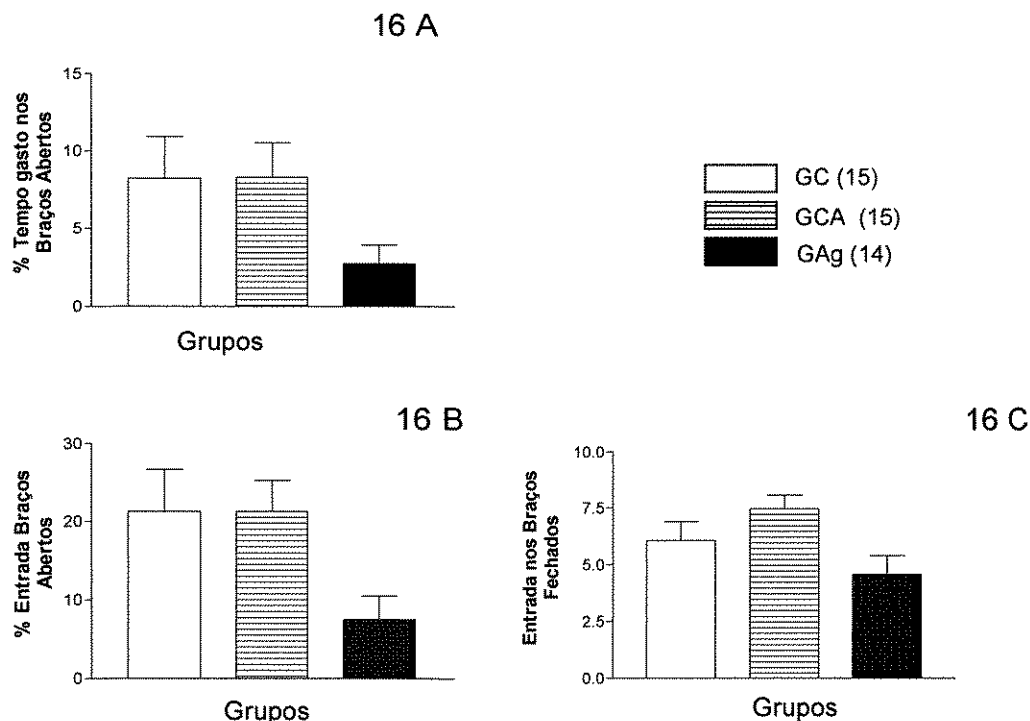


Figura 16: Média ($\pm$ E.P.M.) da %TBA (A), %EBA (B) e NEBF (C) dos grupos controle (GC), controle anestesia (GCA) e agulha (GAg) durante o teste do LCE. (* $p < 0,05$). O número de animais por grupo está indicado em parênteses.

5.2 – Efeito da injeção de formalina no lábio e na ATM sobre o nível de ansiedade de ratos submetidos ao teste do LCE.

A análise de variância revelou que os efeitos dos fatores *Local* e *Tratamento* sobre a ansiedade e atividade locomotora de animais submetidos ao teste do LCE foram significativos e não houve interação entre esses dois fatores.

Com relação ao fator *Local*, observa-se que não houve diferença estatisticamente significativa quanto à ansiedade e a atividade locomotora dos animais, quando a formalina foi injetada na região de lábio ou ATM ($p > 0,05$) (Tabela 6 e Figura 17).

Com relação ao fator *Tratamento*, a administração de formalina 1% aumentou de forma significativa ($p < 0,05$) (Tabela 6 e Figura 17) a ansiedade,

avaliada pela %TBA e pela %EBA. A formalina não alterou a atividade locomotora dos animais submetidos ao teste do LCE, avaliada pelo NEBF, comparada ao controle salina.

Tabela 6

Valores médios da %TBA, %EBA e NEBF dos grupos controle anestesia (GCA), salina lábio (SL), formalina lábio (FL) e formalina ATM (FATM), submetidos ao teste do LCE após a administração de formalina 1% na região orofacial. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão.

Análises	GCA (15)	SL (15)	FL (15)	SATM (15)	FATM (12)
%TBA	8,222 $\pm$ 2,693b	8,009 $\pm$ 1,70b	1,463 $\pm$ 0,6823a	4,161 $\pm$ 1,363b	1,047 $\pm$ 0,4758a
%EBA	21,25 $\pm$ 5,436b	23,51 $\pm$ 4,01b	7,767 $\pm$ 3,133a	9,005 $\pm$ 3,069b	9,017 $\pm$ 4,029a
NEBF	6,067 $\pm$ 0,836b	5,533 $\pm$ 0,838b	4,533 $\pm$ 0,7488b	5,533 $\pm$ 0,713b	4,167 $\pm$ 0,6494b

* $p < 0,05$ Médias com letras distintas diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey.

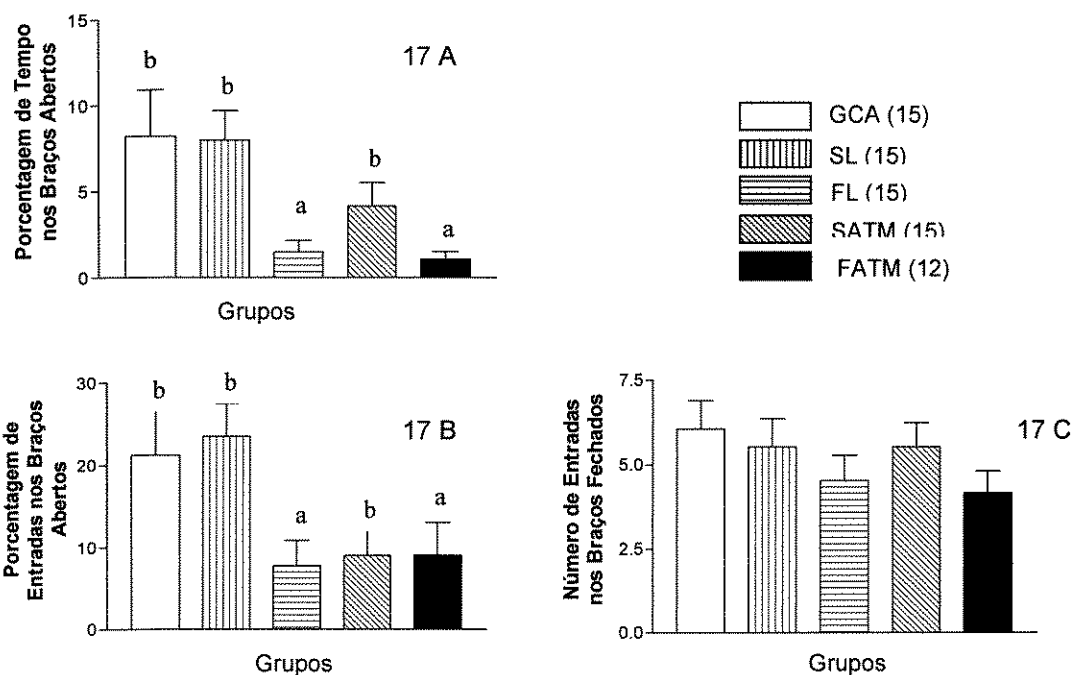


Figura 17: Média ($\pm$ E.P.M.) da %TBA (A), %EBA (B) e NEBF (C), dos grupos controle anestesia (GCA), salina lábio (SL), formalina lábio (FL), salina ATM (SATM) e formalina ATM (FATM) durante o teste do LCE. (* $p < 0,05$). O número de animais por grupo está indicado em parênteses.

5.3 – Efeito da administração de diazepam sobre a ansiedade induzida por nocicepção na região de lábio e ATM de ratos submetidos ao teste do LCE.

A administração intraperitoneal de Diazepam na dose de 1,0 mg/Kg promoveu uma redução significativa ($p < 0,05$, teste de Tukey) na ansiedade induzida pela nocicepção decorrente à injeção de 50 μ L de formalina 1%, tanto no lábio quanto na ATM, como verificado principalmente pela %TBA. Contudo, não produziu interferência na atividade locomotora dos animais, analisada através da %EBA e do NEBF, como ilustrado na Tabela 7 e Figura 18.

Tabela 7

Valores médios da %TBA, %EBA e NEBF dos grupos controle anestesia (GCA), formalina lábio (FL), formalina lábio propileno (FLP), formalina lábio diazepam (FLD), formalina ATM (FATM) e formalina ATM diazepam (FATMD), submetidos ao teste do LCE após a administração de formalina 1% na região orofacial. Médias na horizontal com letras distintas diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão.

Análises	CA (15)	FL (15)	FLP (12)	FLD (15)	FATM (12)	FATMD (11)
%TBA	8,22 $\pm$ 2,69 B	1,46 $\pm$ 0,68 A	0,83 $\pm$ 0,44 A	4,11 $\pm$ 1,68 BC	1,04 $\pm$ 0,47 A	2,66 $\pm$ 1,23 BC
%EBA	21,25 $\pm$ 5,43	7,76 $\pm$ 3,13	5,83 $\pm$ 2,94	15,69 $\pm$ 5,95	9,01 $\pm$ 4,02	7,90 $\pm$ 3,35
NEBF	6,06 $\pm$ 0,83	4,53 $\pm$ 0,74	4,91 $\pm$ 0,77	3,4 $\pm$ 0,55	4,16 $\pm$ 0,64	5,36 $\pm$ 0,946

* $p < 0.05$, Médias com letras distintas diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey.

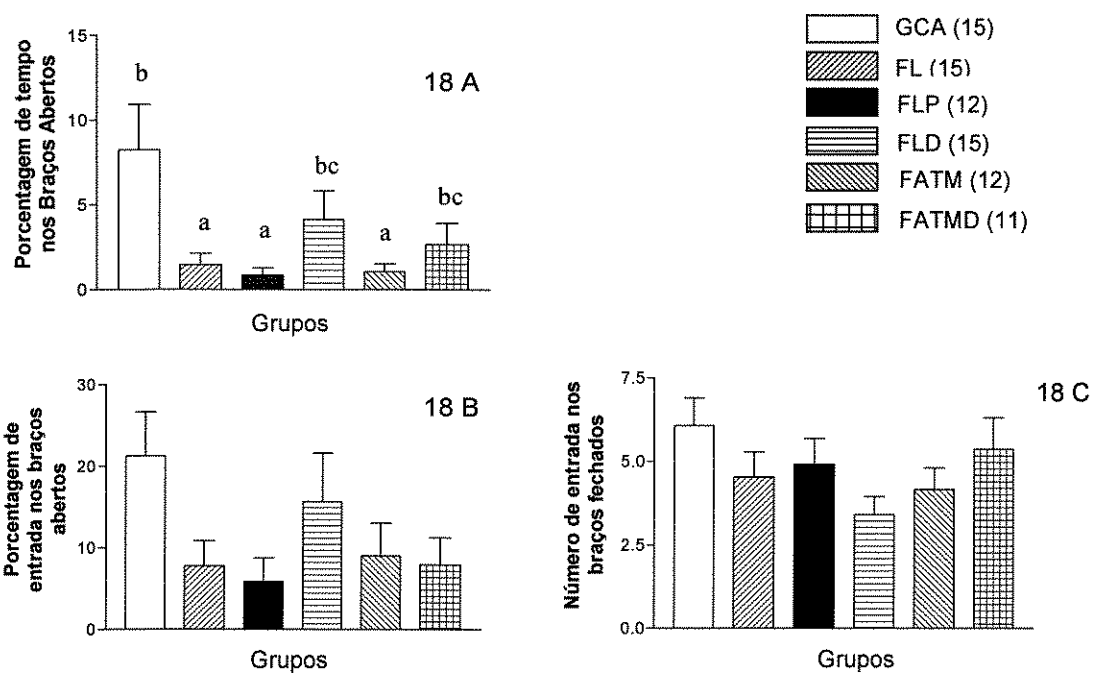


Figura 18: Média ($\pm$ E.P.M.) da %TBA (A), %EBA (B) e NEBF (C), dos grupos controle anestesia (CA), formalina lábio (FL), formalina lábio propileno (FLP), formalina lábio diazepam (FLD), formalina ATM (FATM) e formalina ATM diazepam (FATMD), durante o teste do LCE. (* $p < 0.05$). O número de animais por grupo está indicado em parênteses

6. DISCUSSÃO

Nosso objetivo foi verificar o quanto a nocicepção orofacial induzida pelo teste da formalina em ratos, interfere nos níveis de ansiedade dos animais mensurados a partir do teste do LCE.

Apesar dos ratos apresentarem uma maior atividade no período noturno, optamos por utilizar, na sala de análise comportamental na qual encontrava-se o LCE, iluminação com luz amarela mimetizando o período claro do dia, visto que, Nogueira e Vassilieff (1996) demonstraram que não há diferença na porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos, na porcentagem de entrada nos braços abertos e no número entradas nos braços fechados do LCE, entre análises realizadas nos períodos diurno e noturno.

Para indução da dor optamos pelo teste da formalina, ao invés de outro agente nociceptivo, devido a sua efetividade em induzir comportamentos quantificáveis, bem caracterizados e sensíveis a várias classes de drogas analgésicas (Dubuisson & Dennis, 1977; Hunskaar & Hole, 1987; Tjolsen *et al.*, 1992; Dallel, 1995; Parada 2001). Inclusive sua efetividade em induzir dor quantificável na região orofacial já é confirmada pela literatura especializada (Clavelou *et al.*, 1989; Roveroni *et al.*, 2001).

A literatura apresenta modelos de dor induzidos por diferentes concentrações de formalina (Hunskaar & Hole, 1987; Coderre *et al.*, 1993; Aloisi *et al.*, 1998). Em 1990, Rosland *et al.*, estudaram o efeito de diversas concentrações de formalina para indução de estímulos nociceptivos na pata de ratos. Os referidos autores concluíram que as concentrações entre 0,02 a 0,2% induziam somente a primeira fase do teste e que concentrações acima de 1% induziam ambas as fases. Esse foi o motivo pelo qual no presente estudo optamos por utilizar a menor concentração capaz de provocar comportamentos nociceptivos mensuráveis, ou seja, formalina 1%. Também devemos acrescentar que resultados pilotos mostraram que a nocicepção induzida por altas concentrações

de formalina poderia alterar, além da ansiedade, a atividade locomotora dos animais.

Para a indução de dor através da injeção de agentes algésicos na região periarticular de ratos é imprescindível que os animais sejam previamente anestesiados, posto que, sem algum tipo de indução anestésica seria praticamente impossível realizar injeções na região da ATM, considerando que é um tecido profundo de difícil acesso, além do que também seria eticamente inaceitável. Apesar de ser possível a injeção de formalina no lábio sem anestesia prévia, no presente trabalho, considerando que os níveis de ansiedade seriam comparados entre um grupo que receberia a injeção de formalina no lábio e outro que a receberia na ATM, padronizamos a realização de anestesia nos animais de todos os grupos. Além do que, o fato de anestesiá-los possibilitou excluí-los do trauma provocado pela injeção, o que poderia ser considerado como fator estressor capaz de influenciar diretamente na ansiedade a ser analisada no experimento.

Para a anestesia optamos por utilizar a inalação de halotano. A literatura demonstra que a pré-administração de halotano apesar de poder reduzir, de forma limitada, o edema de pata provocado pela injeção de formalina, não produz efeito inibitório sobre a resposta comportamental nociceptiva que os ratos demonstram ao serem submetidos ao teste da formalina (Lee & Crosby, 1999). Isso nos assegurou a não interferência do halotano na indução do estímulo nociceptivo pela formalina.

Com o objetivo de verificar a possibilidade do halotano alterar o comportamento apresentado pelos animais durante o teste do LCE, realizamos uma comparação entre os animais de um grupo que não recebeu nenhum tipo de tratamento (GC) prévio e aqueles do grupo que foi previamente anestesiado com inalação de halotano (GCA). Os resultados demonstraram que não houve diferença estatisticamente significativa na porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos, na porcentagem de entrada nos braços abertos e no número de entradas nos braços fechados entre o GC e o grupo GCA (figura 16). Através

destes resultados podemos afirmar que o halotano é incapaz de alterar os níveis de ansiedade e a atividade locomotora dos animais analisados pelo teste do LCE, o que corrobora resultados anteriormente demonstrados por Domingos *et al*, 2000. Isso nos permite concluir que o halotano pode ser seguramente utilizado para anestesia de animais submetidos ao teste do LCE, sem que ele interfira nos parâmetros a serem estudados.

Nossos resultados excluem a hipótese de que a inserção da agulha na região da ATM por si só seria capaz de alterar os níveis de ansiedade e a atividade locomotora dos ratos submetidos ao teste do LCE (figura 16). Apesar da porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos, pelos animais nos quais foi introduzida a agulha na região da ATM (GAg), ter sido menor do que nos animais dos grupos controle (GC) e controle anestesia (GCA) (Figura 16), as diferenças não foram estatisticamente significantes para comprovar que o trauma físico provocado pela introdução da agulha seria suficiente para influenciar na ansiedade. Assim, reafirmamos que as alterações na ansiedade verificadas através do teste do LCE, foram causadas pelo agente algésico formalina. Estes resultados foram concordantes com os de Roveroni *et al* (2001), que também não verificaram comportamentos nociceptivos mensuráveis em animais submetidos somente à inserção da agulha na região da ATM.

Considerando que houve a deposição de um certo volume na área injetada (lábio ou ATM), poderíamos aventar a possibilidade de a pressão provocada pelo volume, apesar de pequeno (50 µL), ser um fator importante na ativação de nociceptores locais e, portanto, passível de provocar dor e conseqüentemente alterar a ansiedade. Contudo, não houve diferença estatisticamente significativa na porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos, na porcentagem de entradas nos braços abertos nem no número de entradas nos braços fechados, dos animais do grupo controle anestesia (GCA) comparados aos do grupo que recebeu a injeção de salina na região de lábio (SL) ou na região de ATM (SATM) (Figura 17). Isto nos permite concluir que a injeção

de salina na região orofacial não é capaz de alterar a ansiedade nem a atividade locomotora de ratos submetidos ao teste do LCE.

Uma redução na porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos e na porcentagem de entradas nos braços abertos do LCE induzida pela injeção de formalina na região de lábio e ATM comparado aos respectivos controles, salina lábio (SL) e salina ATM (SATM) (Figura 17) indica, que este procedimento tem um efeito ansiogênico. Ao analisarmos o número de entradas nos braços fechados, notamos que não houve diferença estatisticamente significativa entre os animais do grupo controle anestesia, salina lábio, salina ATM, formalina lábio e formalina ATM, indicando que apesar de a dor induzida pela injeção de formalina aumentar o nível de ansiedade analisada pelo teste do LCE, não houve alteração na atividade locomotora dos animais. Estes resultados corroboram os de Roveroni *et al* (2001), que demonstraram que a injeção de formalina na região orofacial não altera a atividade locomotora dos animais.

A dor orofacial proveniente de tecidos profundos como a ATM apresenta certas peculiaridades (Hu *et al*, 1997). Por exemplo, poucos neurônios nociceptivos são ativados exclusivamente por impulsos provenientes desses tecidos. Tem sido sugerido (Hu *et al*, 1994) que neurônios nociceptivos do subnúcleo caudal apresentam extensiva convergência de fibras nervosas aferentes de diferentes estruturas da região orofacial. Isso explica, parcialmente, a localização imprecisa dos estímulos nociceptivos provenientes dos tecidos orofaciais profundos, como observado nos casos de DTM e dor miofacial (Sessle *et al*, 1995), diferindo do que ocorre em situações de dor em tecidos superficiais, como por exemplo, em quadros de herpes labial recorrente, nos quais o indivíduo é capaz de precisar a localização dos estímulos dolorosos.

Embora existam diferenças entre a dor proveniente de tecidos orofaciais superficiais e profundos, o que poderia refletir na alteração dos níveis de ansiedade, os resultados do presente trabalho demonstram que quando o grupo formalina lábio e formalina ATM foram comparados, a porcentagem de tempo de

permanência nos braços abertos e a porcentagem de entradas nos braços abertos, não diferiu de forma estatisticamente significativa, o que nos permite concluir que a injeção de formalina 1%, na região orofacial é um estímulo nociceptivo que induz ansiedade em um grau similar independente da área na qual é administrada. Provavelmente o mecanismo de ação pelo qual a formalina é capaz de alterar os níveis de ansiedade, envolve a liberação de serotonina endógena que ocorre durante a fase 2 do teste da formalina (Parada *et al*, 2001). Futuros estudos poderiam examinar a ansiedade induzida por dor decorrente da injeção de outros agentes que já são utilizados para indução de dor e/ou inflamação, como óleo de mostarda, carragenina, levedura, caulin entre outros (Wheeler-Aceto *et al*, 1990). Isso permitiria uma melhor análise dos possíveis mecanismos pelos quais a dor orofacial aumenta os níveis de ansiedade.

Devemos considerar também que a exposição ao LCE representa uma novidade aos animais. Estudos (Abbott *et al*, 1986) comprovaram que a apresentação de um novo ambiente ao animal, como é o caso do labirinto, pode reduzir o estímulo nociceptivo provocado pela injeção de formalina, o que parece estar relacionado à atividade do sistema serotoninérgico e a sistemas opióides endógenos (Kelly & Franklin, 1984; Kulkarni, 1980; Teskey *et al*, 1984). Paradoxalmente, por outro lado, não podemos descartar a possibilidade da ansiedade ter sido induzida pela serotonina, o que evidencia mais uma vez a complexa interação entre dor e ansiedade.

Os BDZs, dentre eles o diazepam, são uma classe de drogas psicoativas largamente prescritas para tratamento de distúrbios psicológicos, como é o caso da ansiedade. O mecanismo de ação dos BDZs baseia-se na capacidade dessas drogas potencializarem as respostas ao GABA, principal neurotransmissor inibitório do SNC, quando este é liberado por terminações nervosas. Postula-se que os BDZs modificam a susceptibilidade dos receptores gabaérgicos através da interação com áreas alostéricas destes receptores (Medina, 1993).

A escolha pelo uso do diazepam como ansiolítico no presente trabalho deveu-se ao fato de que, embora os compostos que atuam no receptor GABA/benzodiazepina produzam dados consistentes e reproduzíveis no teste do LCE, este não é o caso dos demais compostos ansiolíticos e ansiogênicos, putativos ou não (Hogg, 1996). Assim, compostos que atuam na neurotransmissão serotoninérgica, nem sempre promovem efeitos ansiolíticos neste teste (Moser, 1989; Pellow *et al*, 1985; Cruz *et al*, 1994), o que é visto como uma crítica ao LCE.

O aumento na porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos do LCE pelos animais dos grupos FLD e FATMD (Figura 18), demonstra que a administração i.p. de diazepam na dose de 1,0 mg/Kg foi capaz de reduzir o quadro de ansiedade provocada pela injeção de formalina 1% tanto no lábio quanto na ATM, de forma estatisticamente significativa comparado aos respectivos controles (FL e FATM). Comprovando que a alteração comportamental observada através do teste do LCE, diz respeito à ansiedade, decorrente do tratamento com formalina.

A porcentagem de entrada nos braços abertos é um índice relacionado com a atividade locomotora do animal e também com a ansiedade. Porém, com relação à ansiedade é menos expressiva do que a porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos. O tratamento com diazepam não alterou a porcentagem de entrada nos braços abertos e nem o número de entrada nos braços fechados do LCE, indicando que na dose de 1,0 mg/Kg o diazepam não interfere na atividade locomotora dos animais (Figura 18). Quanto à porcentagem de entradas nos braços abertos, a análise do gráfico (figura 18B), nos permite verificar que apesar de não haver diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, houve uma variação individual elevada. Esta variação ocorre devido ao próprio conflito gerado pelo teste do LCE, sendo comum neste tipo de teste comportamental.

O fato do diazepam reduzir a ansiedade induzida pela injeção de formalina 1% na região orofacial, não exclui a possibilidade desse ansiolítico estar

agindo diretamente na nocicepção, o que acarretaria em uma alteração na ansiedade mensurada pelo teste do LCE.

Não há na literatura trabalhos demonstrando se o diazepam tem efeito antinociceptivo no teste da formalina na região orofacial. Contudo, resultados de Pang *et al* (2001), demonstraram que a injeção i.p. de diazepam (1 mg/Kg) 15 minutos antes da formalina, reduziu a resposta nociceptiva, nas duas fases causada pela injeção de 20 µL de formalina 1% na pata. Apesar da dose de diazepam e da concentração de formalina por nós utilizadas ter sido a mesma do referido trabalho, devemos considerar que tanto o período da injeção do ansiolítico quanto o volume de formalina injetado diferiram entre os trabalhos. Há também de se mencionar que o local de injeção do agente algésico difere entre o nosso e o trabalho de Pang *et al* (2001).

Desta forma, não podemos excluir a possibilidade de que a ação ansiolítica do diazepam no presente trabalho seja devido à redução do comportamento nociceptivo no teste da formalina, o que decorreria parcialmente por causa da sedação, que é difícil de ser diferenciada de analgesia. Entretanto, é mais provável que a analgesia e não a sedação, seja o fator principal na redução do comportamento nociceptivo, e conseqüentemente, da ansiedade no presente trabalho. Isto porque a sedação reduziria a atividade motora geral dos animais, contudo, o fato de não haver diferença estatisticamente significativa na porcentagem de entrada nos braços abertos e no número de entradas nos braços fechados entre os grupos tratados com diazepam e os controles (figura 18), evidencia que a atividade locomotora manteve-se inalterada.

Estudos demonstram que o diazepam em baixas doses (0,5 mg/Kg), não altera a resposta nociceptiva induzida pelo teste da formalina na pata de ratos (Rosland *et al*, 1990a). Contudo, a inexistência de trabalhos analisando a capacidade do diazepam (1 mg/Kg) interferir no estímulo nociceptivo provocado por injeção de formalina na região orofacial, instiga-nos a sugerir a realização de experimentos futuros, através de modelos comportamentais, que possam verificar esta possibilidade.

Para a dissolução do diazepam o veículo utilizado foi o propilenoglicol 40%. Apesar de estudarmos a ansiedade induzida por dor no lábio e na ATM, para a comprovação da inocuidade do propilenoglicol optamos por realizar apenas o grupo FLP e excluir a realização do grupo FATMP. O principal motivo que nos levou a esta decisão foi o fato de não ter havido diferença estatisticamente significativa nos níveis de ansiedade induzidos por dor proveniente do lábio e da ATM. Ainda devemos mencionar fatores éticos, pois a realização do grupo FATMP, além de não acrescentar resultados expressivos ao nosso trabalho, implicaria no aumento do número de animais experimentais. A fim de confirmar se este veículo poderia interferir na ansiedade e dessa forma mascarar os efeitos do ansiolítico, alterando os parâmetros analisados pelo teste do LCE, foi realizado um grupo que recebeu formalina no lábio e injeção intraperitoneal de propilenoglicol (FLP) em volume similar ao de diazepam. Os resultados encontrados (Figura 18), demonstram que o propilenoglicol não alterou nenhum dos parâmetros do LCE por nós analisados, comparado ao grupo formalina lábio. Dessa forma, conclui-se que a redução da ansiedade apresentada pelos grupos tratados com diazepam em nada se relaciona com o veículo utilizado. Nossos resultados confirmam os de Pini *et al* (1997), quanto à inocuidade do propilenoglicol no teste do LCE.

Assim, aceitamos a hipótese de que a nocicepção na região orofacial de ratos, determinada pela injeção de formalina 1% no lábio e na ATM é capaz de influenciar os níveis de ansiedade de maneira indistinta com relação à tecidos orofaciais superficiais e profundos, avaliados através do modelo experimental do LCE.

Embora nossos resultados comprovem que a nocicepção induzida na região orofacial é capaz de aumentar os níveis de ansiedade no modelo animal estudado, não podemos afirmar ou negar se a ansiedade poderia interferir na nocicepção. Devemos considerar que devido ao fato de várias vias nervosas estarem envolvidas tanto na dor quanto na ansiedade, estes dois fatores podem se sobrepor e mascarar os resultados.

Modelos animais permitem estudar nocicepção, mas não possibilitam o estudo da percepção dolorosa. Considerando que o mais importante a ser analisado é a percepção da dor, e que esta depende de uma série de fatores aos quais todos os indivíduos estão sujeitos (emocionais, culturais, sociais, etc), estudos em humanos seriam bastante válidos para desvendar a complexa relação existente entre dor orofacial e ansiedade.

Entretanto, os modelos experimentais animais são de suma importância, pois podem possibilitar o estudo dos mecanismos pelos quais a dor pode influenciar na ansiedade e vice-versa, e o conhecimento destes mecanismos pode ter importantes implicações clínicas, principalmente no que se refere ao desenvolvimento de novos fármacos mais específicos e com menores efeitos colaterais, para o controle da dor e da ansiedade, justificando a necessidade de estudos direcionados a esta área.

7. CONCLUSÃO

- 1) A nocicepção na região orofacial induzida pela injeção de formalina 1% em tecido superficial (lábio) e profundo (ATM) de ratos aumenta o nível de ansiedade dos animais sem alterar a atividade locomotora.
- 2) O diazepam foi capaz de reduzir a ansiedade provocada pela dor orofacial proveniente tanto de tecidos superficiais quanto profundos.

REFERÊNCIAS*

Abbott FV, Franklin KB, Connell B. The stress of a novel environment reduces formalin pain: possible role of serotonin. **Eur J Pharmacol.** 1986; 126(1-2): 141-4.

Aghabeigi B. The pathophysiology of pain. **Br Dent J.** 1992; 173(3): 91-7.

Al Absi M, Rokke PD. Can anxiety help us tolerate pain? **Pain.** 1991; 46(1): 43-51.

Alder ME, Dove SB, Murrah VA, Salinas F, Williams RF. Magnetic resonance spectroscopy of inflammation associated with the temporomandibular joint. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.** 1992; 74(4): 515-23.

Aloisi AM, Ceccarelli I, Lupo C. Behavioural and hormonal effects of restraint stress and formalin test in male and female rats. **Brain Res Bull.** 1998; 47(1): 57-62.

Arntz A, Hildebrand M, van den Hout M. Overprediction of anxiety, and disconfirmatory processes, in anxiety disorders. **Behav Res Ther.** 1994; 32(7):709-22.

Bell WE. **Orofaciais pains. Classification, diagnosis, management.** 4.ed. Chicago : Year Book Medical Publishers ; 1989. p.101-13.

Brandão ML. **Psicofisiologia.** Rio de Janeiro: Atheneu; 1995.

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseada no modelo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Broton JG, Rosenfeld JP. Effects of trigeminal tractotomy on facial thermal nociception in the rat. **Brain Res.** 1985; 333(1): 63-72.

Cadet R, Aigouy L, Woda A. Sustained hyperalgesia can be induced in the rat by a single formalin injection and depends on the initial nociceptive inputs. **Neurosci Lett.** 1993; 156(1-2): 43-6.

Campbell JN, Meyer RA, Raja SN. Is nociceptor activation by alpha-1adrenoreceptors the culprit in sympathetically maintained pain? **J Am Pain Soc.** 1992; 1: 3-11.

Carden SE, Hofer MA. Isolation-induced vocalization in Wistar rat pups is not increased by naltrexone. **Physiol Behav.** 1991; 49(6): 1279-82.

Carlson CR, Okeson JP, Falace DA, Nitz AJ, Curran SL, Anderson D. Comparison of psychologic and physiologic functioning between patients with masticatory muscle pain and matched controls. **J Orofac Pain.** 1993; 7(1): 15-22.

Clavelou P, Pajot J, Dallel R, Raboisson P. Application of the formalin test to the study of orofacial pain in the rat. **Neurosci Lett.** 1989; 103(3): 349-53.

Clavelou P, Dallel R, Orliaguet T, Woda A, Raboisson P. The orofacial formalin test in rats: effects of different formalin concentrations. **Pain.** 1995; 62(3): 295-301.

Coderre TJ, Vaccarino AL, Melzack R. Central nervous system plasticity in the tonic pain response to subcutaneous formalin injection. **Brain Res.** 1990; 535(1): 155-8.

Coderre TJ, Fundytus ME, McKenna JE, Dalal S, Melzack R. The formalin test: a validation of the weighted-scores method of behavioural pain rating. **Pain.** 1993; 54(1): 43-50.

Cooper SA. Treating acute pain: do's and don'ts, pros and cons. **J Endod.** 1990; 16(2): 85-91.

Correa CR, Calixto JB. Evidence for participation of B1 and B2 kinin receptors in formalin-induced nociceptive response in the mouse. **Br J Pharmacol.** 1993; 110(1): 193-8.

Crawley JN. A monoamine oxidase inhibitor reverses the 'separation syndrome' in a new hamster separation model of depression. **Eur J Pharmacol.** 1985; 112(1): 129-33.

Crawley JN. Neuropharmacologic specificity of a simple animal model for the behavioral actions of benzodiazepines. **Pharmacol Biochem Behav.** 1981; 15(5): 695-9.

Cruz AP, Frei F, Graeff FG. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. **Pharmacol Biochem Behav.** 1994; 49(1): 171-6.

Dallel R, Raboisson P, Clavelou P, Saade M, Woda A. Evidence for a peripheral origin of the tonic nociceptive response to subcutaneous formalin. **Pain.** 1995; 61(1): 11-6.

Dao TT, Lund JP, Lavigne GJ. Comparison of pain and quality of life in bruxers and patients with myofascial pain of the masticatory muscles. **J Orofac Pain.** 1994; 8(4): 350-6.

Darian-Smith I. Neural mechanisms of facial sensation. **Int Rev Neurobiol.** 1966; 9: 301-95.

Davis M, Cassella JV, Kehne JH. Serotonin does not mediate anxiolytic effects of buspirone in the fear-potentiated startle paradigm: comparison with 8-OH-DPAT and ipsapirone. **Psychopharmacology (Berl)**. 1988; 94(1): 14-20.

Dawson GR, Crawford SP, Collinson N, Iversen SD, Tricklebank MD. Evidence that the anxiolytic-like effects of chlordiazepoxide on the elevated plus maze are confounded by increases in locomotor activity. **Psychopharmacology (Berl)**. 1995;118(3):316-23.

Domingos EF, Tambelli CH, Marcondes FK. Level of anxiety in rats under halothane anesthesia. *In: 3rd World Congress on Stress*, 2000 Set 24-27. Dublin, Ireland. Dublin; 2000. p.40. [Abstract].

Donnerer J, Amann R, Lembeck F. Neurogenic and non-neurogenic inflammation in the rat paw following chemical sympathectomy. **J Neurosci**. 1991;45(3):761-6.

Dray A. Inflammatory mediators of pain. **Br J Anaesth**. 1995; 75(2): 125-31.

Dubner R. Pain control in dentistry: the anatomic and physiologic basis of orofacial pain. **Compend Contin Educ Dent**. 1986; 7(6): 408-18.

Dubuisson D, Dennis SG. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain**. 1977; 4(2): 161-74.

Dworkin SF, Huggins KH, LeResche L, Von Korff M, Howard J, Truelove E *et al*. Epidemiology of signs and symptoms in temporomandibular disorders: clinical signs in cases and controls. **J Am Dent Assoc**. 1990; 120(3): 273-81.

Fernandez-Guasti A, Picazo O. The actions of diazepam and serotonergic anxiolytics vary according to the gender and the estrous cycle phase. **Pharmacol Biochem Behav.** 1990; 37(1): 77-81.

Fernandes C, File SE. The influence of open arm ledges and maze experience in the elevated plus-maze. **Pharmacol Biochem Behav.** 1996;54(1):31-40.

File SE, Pellow S. The effects of triazolobenzodiazepines in two animal tests of anxiety and in the holeboard. **Br J Pharmacol.** 1985; 86(3): 729-35.

File SE, Baldwin HA, Aranko K. Anxiogenic effects in benzodiazepine withdrawal are linked to the development of tolerance. **Brain Res Bull.** 1987; 19(5): 607-10.

File SE, Andrews N, Wu PY, Zharkovsky A, Zangrossi Jr H. Modification of chlordiazepoxide's behavioural and neurochemical effects by handling and plus-maze experience. **Eur J Pharmacol.** 1992; 218(1): 9-14.

Fiorentino PM, Cairns BE, Hu JW. Development of inflammation after application of mustard oil or glutamate to the rat temporomandibular joint. **Arch Oral Biol.** 1999; 44(1): 27-32.

Franklin KBJ, Abbott FV. Pentobarbital, diazepam and ethanol abolish the inter-phase diminution of pain in the formalin test: evidence for pain modulation by GABA_A receptors. **Pharmacol Biochem Behav.** 1993; 46(3): 661-6.

Fujiyoshi Y, Yamashiro T, Deguchi T, Sugimoto T, Takano-Yamamoto T. The difference in temporal distribution of c-Fos immunoreactive neurons between the medullary dorsal horn and the trigeminal subnucleus oralis in the rat following experimental tooth movement. **Neurosci Lett.** 2000; 283(3): 205-8.

Gatchel RJ, Garofalo JP, Ellis E, Holt C. Major psychological disorders in acute and chronic TMD: an initial examination. **J Am Dent Assoc.** 1996; 127(9): 1365-74.

Gomita Y, Moriyama M, Ichimaru Y, Araki Y. Effects of anxiolytic drugs on escape behavior induced by dorsal central gray stimulation in rats. **Physiol Behav.** 1991; 49(1): 125-9.

Gonzales RA, Weiss F. Suppression of ethanol-reinforced behavior by naltrexone is associated with attenuation of the ethanol-induced increase in dialysate dopamine levels in the nucleus accumbens. **J Neurosci.** 1998; 18(24): 10663-71.

Graeff FG, Viana MB, Tamaz C. The elevated T maze, a new experimental model of anxiety and memory: effect of diazepam. **Braz J Med Biol Res.** 1993; 26(1): 67-70.

Graeff FG. Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. **Braz J Med Biol Res.** 1994; 27(4): 811-829.

Graeff FG, Viana MB, Mora PO. Dual role of 5-HT in defense and anxiety. **Neurosci Biobehav Rev.** 1997; 21(6): 791-9.

Graeff FG, Brandão ML. **Neurobiologia das doenças mentais.** 5.ed. São Paulo: Lemos Editorial; 1999. p.181.

Graeff FG, Guimarães FS. **Fundamentos de psicofarmacologia.** São Paulo: Atheneu; 2001.

Graeff FG. Serotonina, matéria cinzenta periaquedutal e transtorno do pânico. **Rev Bras Psiquiatr.** 2003; 25(Supl.2): 42-5.

Graeff FG. Serotonin, the periaqueductal gray and panic. **Neurosci Biobehav Rev.** 2004; 28(3): 239-59.

Griebel G, Blanchard DC, Jung, A, Masuda CK, Blanchard, RJ. 5-HT_{1A} agonists modulate mouse antipredator defensive behavior differently from the 5-HT_{2A} antagonist pirenperone. **Pharmacol Biochem Behav.** 1995; 51(2-3): 235-44.

Griffiths RH. Report of the President's Conference on Examination, Diagnosis and Management of Temporomandibular Disorders. **Am J Orthod.** 1983; 83(6): 514-17.

Haas DA, Nakanishi O, MacMillan RE, Jordan RC, Hu JW. Development of an orofacial model of acute inflammation in the rat. **Arch Oral Biol.** 1992; 37(5): 417-22.

Handley SL, Mithani S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.** 1984; 327(1): 1-5.

Hathaway CB, Hu JW, Bereiter DA. Distribution of Fos-like immunoreactivity in the caudal brainstem of the rat following noxious chemical stimulation of the temporomandibular joint. **J Comp Neurol.** 1995; 356(3): 444-56.

Henry JL, Yashpal K, Pitcher GM, Coderre TJ. Physiological evidence that the "interphase" in the formalin test is due to active inhibition. **Pain.** 1999; 82(1): 57-63.

Hogg S. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. **Pharmacol Biochem Behav.** 1996; 54(1): 21-30.

Hu JM *et al.* Electromyographic and trigeminal brainstem neuronal changes associated with inflammatory irritation of superficial and deep craniofacial tissues in

rats. *In*: Gebhart GF, Hammond DL, Jensen TS. (Ed.) **Proceedings of the 7th World Congress on Pain**: progress in pain research and management. Seattle: IASP Press; 1994. v.2.

Hu JW *et al*. Deep craniofacial pain: involvement of trigeminal subnucleus caudalis and its modulation. *In*: Jensen TS, Turner JA, Wiesenfeld-Hallin Z. (Ed.) **Proceedings of the 8th World Congress on Pain**: progress in pain research and management. Seattle: IASP Press; 1997. v.8.

Hunskar S, Fasmer OB, Hole K. Acetylsalicylic acid and morphine on immediate responses to acute noxious stimulation. **J Neurosci Methods**. 1985;14:69-76.

Hunskar S, Hole K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**. 1987; 30(1): 103-14.

Jensen TS, Krebs B, Nielsen J, Rasmussen P. Immediate and long-term phantom limb pain in amputees: incidence, clinical characteristics and relationship to pre-amputation limb pain. **Pain**. 1985; 21(3): 267-78.

Kapczinski F, Quevedo J, Izquierdo IL, *et al*. **Bases biológicas dos transtornos psiquiátricos**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed; 2004.

Kelly SJ, Franklin KBJ. Evidence that stress augments morphine analgesia by increasing brain tryptophan. **Neurosci Lett**. 1984; 44(3): 305-10.

Krough-Poulson WG, Olson A. Occlusal disharmonies and dysfunction of the stomatognathic system. **Dent Clin North Am**. 1966 : 627-35.

Kulkarni SK. Heat and other physiological stress-induced analgesia: Catecholamine mediated and naloxone reversible response. **Life Sci**. 1980; 27(3): 185-8.

Lee I, Crosby G. Halothane effect on formalin-induced paw edema and flinching in rat. **J Korean Med Sci.** 1999; 14(1): 34-38.

Lent R. **Cem Bilhões de Neurônios**: conceitos fundamentais da neurociência. São Paulo: Atheneu; 2001. cap.7, p.209-40.

LeResche L. Epidemiology of temporomandibular disorders: implications for the investigation of etiologic factors. **Crit Rev Oral Biol Med.** 1997; 8(3): 291-305.

LeResche L, Mancl L, Sherman JJ, Gandara B, Dworkin SF. Changes in temporomandibular pain and other symptoms across the menstrual cycle. **Pain.** 2003; 106:253-61.

Lister RG. The benzodiazepine receptor inverse agonists FG 7142 and RO 15-4513 both reverse some of the behavioral effects of ethanol in a holeboard test. **Life Sci.** 1987; 41(12): 1481-9.

Lund JP, Lavigne GJ, Dubner R, Sessle BJ. **Orofacial Pain**: from basic science to clinical management. Carol Stream: Quintessence Books; 2001. 300p.

Lund JP, Lavigne GJ, Dubner R, Sessle BJ. **Dor orofacial** : da ciência básica a conduta clínica. São Paulo : Quintessence; 2002.

Machado A. **Neuroanatomia funcional**. 2.ed. São Paulo: Atheneu; 1993.

Marbach JJ, Lennon MC, Dohrenwend BP. Candidate risk factors for tempomandibular pain and dysfunction syndrome: psychosocial, health behavior, physical illness and injury. **Pain.** 1988; 34(2): 139-51.

McBlane JW, Handley SL. Effects of two stressors on behaviour in the elevated X-maze: preliminary investigation of their interaction with 8-OH-DPAT. **Psychopharmacology (Berl)**. 1994; 116(2): 173-82.

McCall WD, Tanner KD, Levine JD. Formalin induces biphasic activity in C-fibers in the rat. **Neurosci Lett**. 1996; 208(1): 45-8.

McNeill C. **Temporomandibular disorders**: guidelines for classification, assessment, and management. 2nd ed. Carol Stream: Quintessence Publishing; 1993.

Medina JH, Paladini AC, Izquierdo I. Naturally occurring benzodizepines and benzodiazepine-like molecules in brain. **Behavioural Brain Research**. 1993. 58(1-2): 1-8.

Melzack R, Wall PD. Pain mechanisms: a new theory. **Science**. 1965; 150(699): 971-9.

Mersky, Y.H. Classification of chronic pain. Descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. Prepared by the International Association for the Study of Pain, Subcommittee on Taxonomy. **Pain Suppl**. 1986; 3, p.S1-S226, 1986.

Methot C, Deutsch R The effect of diazepam on a conditioned emotional response in the rat. **Pharmacol Biochem Behav**. 1984; 20(4): 495-9.

Montgomery KC. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**. 1955;48:254-60.

Moser PC. An evaluation of the elevated plus-maze test using the novel anxiolytic buspirone. **Psychopharmacology (Berl)**. 1989; 99(1): 48-53.

Munglani R, Hunt SP. Molecular biology of pain. **Br J Anaesth**. 1995; 75(2): 186-92.

Nitzan DW, Dolwick MF. An alternative explanation for the genesis of closed-lock symptoms in the internal derangement process. **J Oral Maxillofac Surg**. 1991; 49(8): 810-5.

Nogueira E, Vassilieff VS. Methodological evaluation of the elevated plus-maze (EPM) test for anxiety in rats. **Rev Cienc Biomed**. 1996; 17: 47-54.

Ojugas AC. **A dor através da história e da arte**. Cleveland: Atlas Medical Publishing; 1999.

Okeson JP. **Tratamento das desordens temporomandibulares e oclusão**. 4.ed. São Paulo: Artes Médicas; 2000.

Overstreet DH, Pucilowski O, Rezvani AA, Janowsky DS. Administration of antidepressants, diazepam and psychomotor stimulants further confirms the utility of Flinders Sensitive Line rats as an animal model of depression. **Psychopharmacology (Berl)**. 1995; 121(1): 27-37.

Pang CS, Tsang SF, Yang JC. Effects of melatonin, morphine and diazepam on formalin-induced nociception in mice. **Life Sciences**. 2001; 68(8): 943-51.

Papez JW. A proposed mechanism of emotion. **Arch Neurol of Psychiatry**. 1937 ; 38 :725-43.

Parada CA, Tambeli CH, Cunha FQ, Ferreira SH. The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced nociception. **Neuroscience**. 2001; 102(4): 937-44.

Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open-closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J Neurosci Meth**. 1985; 14(3): 149-67.

Pellow S, Johnston AL, File SE. Selective agonists and antagonists for 5-hydroxytryptamine receptor subtypes, and interactions with yohimbine and FG 7142 using the elevated plus-maze test in the rat. **J Pharm Pharmacol**. 1987; 39(11): 917-28.

Pini A, Vitale G, Ottani A, Sandrini M. Naloxone-Reversible Antinociception by paracetamol in the rat. **Pharmacol Exp Ther**. 1997; 280(2): 934-40.

Pratt JA. The neuroanatomical basis of anxiety. **Pharmacol Ther**. 1992; 55(2): 149-81.

Puig S, Sorkin LS. Formalin-evoked activity in identified primary afferent fibers: systemic lidocaine suppresses phase-2 activity. **Pain**. 1996; 64(2): 345-55.

Raboisson P, Dallel R, Clavelou P, Sessle BJ, Woda A. Effects of subcutaneous formalin on the activity of trigeminal brain stem nociceptive neurons in the rat. **J Neurophysiol**. 1995; 73(2): 496-505.

Rosland JH, Hunskaar S, Hole K. Diazepam attenuates morphine antinociception test-dependently in mice. **Pharmacol Toxicol**. 1990; 66(5): 382-6.

Rosland JH, Tjolsen A, Maehle B, Hole K. The formalin test in mice: effect of formalin concentration. **Pain**. 1990; 42(2): 235-42.

- Rosland JH. The formalin test in mice: the influence of ambient temperature. **Pain.** 1991; 45(2): 211-6.
- Roveroni R, Parada AC, Veiga MCFA, Tambeli CH. Development of a behavioral model of TMJ pain in rats: the TMJ formalin test. **Pain.** 2001; 94(2): 185-91.
- Schmidt R, Schmelz M, Forster C, Ringkamp M, Torebjork E, Handwerker H. Novel classes of responsive and unresponsive C nociceptors in human skin. **J Neurosci.** 1995; 15(1 pt1): 333-41.
- Sedivec MJ, Ovelmen-Levitt J, Karp R, Mendell LM. Increase in nociceptive input to spinocervical tract neurons following chronic partial deafferentation. **J Neurosci.** 1983; 3(7): 1511-9.
- Sessle BJ. Brainstem mechanisms underlying craniofacial pain and its modulation. **Adv Pain Res Ther.** 1995; 22: 413-21.
- Sessle BJ. Mechanism of trigeminal and occipital pain. **Pain Rev.** 1996; 3: 91-116.
- Sessle BJ. Acute and chronic craniofacial pain: brainstem mechanisms of nociceptive transmission and neuroplasticity, and their clinical correlates. **Crit Rev Oral Biol Med.** 2000; 11(1): 57-91.
- Shibata M, Ohkubo T, Takahashi H, Inoki R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. **Pain.** 1989; 38(3): 347-52.
- Solberg WK, Flint RT, Brantner JP. Temporomandibular joint pain and dysfunction: a clinical study of emotional and occlusal components. **J Prosthet Dent.** 1972; 28(4): 412-22.

Storey AT. Sensory functions of the temporomandibular joint. **J Can Dent Assoc.** 1968; 34(6): 294-300.

Swift JQ, Roszkowski MT, Alton T, Hargreaves KM. Effect of intra-articular versus systemic anti-inflammatory drugs in a rabbit model of temporomandibular joint inflammation. **J Oral Maxillofac Surg.** 1998; 56(11): 1288-95.

Taylor BK, Peterson MA, Basbaum AI. Persistent cardiovascular and behavioral nociceptive responses to subcutaneous formalin require peripheral nerve input. **J Neurosci.** 1995;15(11):7575-7584.

Teixeira MJ. Fisiopatologia da nocicepção e da supressão da dor. *In:* Siqueira JTT, Ching LH (ed.) **Dor Orofacial/ATM: bases para o diagnóstico clínico.** Curitiba: Maio; 2000. p.39-48.

Teixeira MJ. Fisiopatologia da nocicepção e da supressão da dor. **J Bras Oclusão ATM Dor Orofac.** 2001; 1(4). P.329-34.

Teng CJ, Abbott FV. The formalin test: a dose-response analysis at three developmental stages. **Pain.** 1998; 76(3): 337-47.

Teskey GC, Kavaliers M, Hirst M. Social conflict activates opioid analgesic and ingestive behaviors in male mice. **Life Sci.** 1984 35(3): 303-15.

Thilander B. Innervation of the temporomandibular joint capsule in man. **Trans Royal School Dent.** 1961; 7: 9-67.

Thrane PS, Maehlen J, Stoltenberg L, Brandtzaeg P. Retrograde axonal cytokine transport: a pathway for immunostimulation in the brain inducing hypoxia and sudden infant death? **Med Hypotheses.** 1995; 44(2): 81-4.

Tjolsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**. 1992; 51(1): 5-17.

Torebjork HE, Lundberg LER, Lamotte RH. Central changes in processing of mechanoreceptive input in capsaicin-induced secondary hyperalgesia in humans. **Journal of Physiology**. 1992; 448: 765-80.

Treit D. Animal models for the study of anti-anxiety agents: a review. **Neurosci Biobehav Rev**. 1985; 9(2): 203-22.

Treit D, Menard J, Royan C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus maze. **Pharmacol Biochem Behav**. 1993; 44(2): 463-9.

Treit D, Fundytus M. Thigmotaxis as a test for anxiolytic activity in rats. **Pharmacol Biochem Behav**. 1989; 31: 959-62.

Tsai CM, Chiang CY, Yu SM, Sessle BJ. Involvement of trigeminal subnucleus caudalis (medullary dorsal horn) in craniofacial nociceptive reflex activity. **Pain**. 1999; 81(1-2): 115-28.

Vogel JR, Beer B, Clody DE. A simple and reliable conflict procedure for testing anti-anxiety agents. **Psychopharmacology** 1971; 21(1):1-7.

Wheller-Aceto H, Porreca F, Cowan A. The rat paw formalin test; comparison of noxious agents. **Pain**. 1990; 40(2): 229-38.

Wheeler-Aceto H, Cowan A. Naloxone causes apparent antinociception and pronociception simultaneously in the rat paw formalin test. **Eur J Pharmacol**. 1993; 236(2): 193-9.

Winslow JT, Insel TR. The infant rat separation paradigm: a novel test for novel anxiolytics. **Trends Pharmacol Sci.** 1991; 12(11): 402-4.

Woolf CJ. Windup and central sensitization are not equivalent. **Pain.** 1996; 66(2-3): 105-8.

Young RF, Perryman KM. Pathways for orofacial pain sensation in the trigeminal brain-stem nuclear complex of the Macaque monkey. **J Neurosurg.** 1984; 61(3): 563-8.

ANEXO 01



INSTITUTO DE BIOLOGIA
UNICAMP

CEEA-IB-UNICAMP

Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 392-1, sobre "Influência da dor propiocal em tecidos superficiais e profundos sobre o nível de ansiedade em ratos" sob a responsabilidade de Faustina Klein Marcondes

..... 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 7/6/02.

Campinas, 07 de junho de 2002.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº "392-1", entitled "Influence of propiocal pain in superficial and deep tissue on the anxiety level in rats".

is in agreement with the Ethical Principles in 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 7/6/02.

Campinas 07 de junho de 2002.

Alba R. M. Souza Brito
Prof(a) Dr(a) Alba R. M. Souza Brito
Presidente – CEEA/IB/UNICAMP