

RENATA CAVENAGHI ROVERONI

Cirurgiã-Dentista

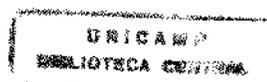
UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

***DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO COMPORTAMENTAL DE DOR NA
ATM DE RATOS: PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES H_1 .***

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

Piracicaba-SP

1999



RENATA CAVENAGHI ROVERONI

Cirurgiã-Dentista

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

**DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO COMPORTAMENTAL DE DOR NA
ATM DE RATOS: PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES H_1 .**

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

Este exemplar foi devidamente corrigido,
de acordo com a Resolução CCPG-026/83
CPG 24/10/1988
Cláudia
Assinatura do Orientador

**Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Herrera Tambeli
FOP-UNICAMP**

**Banca Examinadora:
Profa. Dra. Maria Cecília Ferraz de Arruda Veiga
Dr. Carlos Amílcar Parada**

Piracicaba-SP

1999

UNIDADE	B6
N.º CHAMADA:	UNICAMP
V.	Ex.
T.º BC /	40527
PROC.	278100
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	911,00
DATA	16/03/00
N.º CPD	

CM-00139107-9

Ficha Catalográfica

R769d	<p>Roveroni, Renata Cavenaghi. Desenvolvimento de um modelo comportamental de dor na ATM de ratos: participação dos receptores H₁. / Renata Cavenaghi Roveroni. – Piracicaba, SP : [s.n.], 1999. 89p. : il.</p> <p>Orientadora : Profª Drª Cláudia Herrera Tambeli. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.</p> <p>1. Dor. 2. Articulação temporomandibular. 3. Formaldeído. I. Tambeli, Cláudia Herrera. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.</p>
-------	--

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



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de MESTRADO, em sessão pública realizada em 01 de Dezembro de 1999, considerou a candidata RENATA CAVENAGHI ROVERONI aprovada.

1. Profa. Dra. CLAUDIA HERRERA TAMBELI

Claudia

2. Prof. Dr. CARLOS AMILCAR PARADA

C. Amílcar P.

3. Profa. Dra. MARIA CECILIA FERRAZ ARRUDA VEIGA

Maria Cecilia Ferraz Arruda Veiga

AGRADECIMENTOS:

À Profª Drª. Cláudia Herrera Tambeli, muito obrigada por acreditar em mim, quando eu mesma não acreditava. Obrigada por ter me dado a chance e os meios de realizar um sonho...

Ao Dr. Carlos A. Parada, obrigada pelo estímulo que me deu desde o início, agradeço por ter participado ativamente deste trabalho, seus conhecimentos e seu espírito crítico direcionaram e enriqueceram nossa pesquisa.

À Profª Drª. Maria Cecília Ferraz de Arruda Veiga, professora titular da área de Fisiologia e Biofísica do Sistema Estomatognático, obrigada pela chance de realizar esse curso, pelo constante estímulo e por sua simpatia.

À Prof.a. Dra. Fernanda Klein Marcondes, admiro seu pragmatismo e objetividade, muito obrigada por seu apoio em um dos momentos mais difíceis, é bom poder contar com uma pessoa com tal senso de justiça.

Ao senhor Carlos Alberto Feliciano e à senhora Shirley Rosana Sbravati Moreto, obrigada pelo ombro amigo nos momentos difíceis e pela enorme ajuda nos momentos de necessidade.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

À Cibele Cristina Rodrigues e à Kelly Roberta de Souza Cunha, pela boa vontade e auxílio.

A todos meus colegas de turma, especialmente Ariana, Luciana e Viviane, nem imaginava que poderia encontrar pessoas tão especiais quanto vocês. Se um dia o tempo e a distância nos separarem guardarei, boas lembranças da amizade de vocês no meu coração. Ao colega Franco Arsati, companheiro de trabalho e das horas difíceis.

À Heloísa Maria Ceccotti (bibliotecária) e Érica Alessandra Pinho (secretaria de pós-graduação) obrigada pelo auxílio, gentileza e eficiência.

À Profª Drª Gláucia Maria Bozi Ambrosano pelo grande auxílio na análise estatística deste trabalho.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP-Unicamp) e ao diretor da mesma, Prof. Dr. Antônio Wilson Sallum. À CAPES, pelo apoio financeiro.

Aos meus pais, obrigada por tudo...

À minha tia Eleonor, com sempre posso contar, muito obrigada por torcer por mim.

À minha irmã Ana Cláudia, agradeço seu constante estímulo.

Ao meu noivo Marçal, obrigada pela ajuda, pelo companheirismo, pela paciência, pelo apoio e pela compreensão.

À minha colega Roberta, obrigada pelo empurrão inicial e o incentivo. À Patrícia Maria Helena e Godofredo, agradeço pela companhia nas viagens. À Renata obrigada pela ajuda.

SUMÁRIO:

Páginas

RESUMO.....	01
ABSTRACT.....	03
INTRODUÇÃO.....	05
REVISÃO DE LITERATURA.....	11
▪ Mecanismos básicos da dor orofacial.....	11
▪ O teste da formalina.....	18
▪ O sistema histaminérgico.....	23
MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
▪ Animais.....	27
▪ Teste comportamental.....	27
▪ Soluções utilizadas.....	28
▪ Grupos experimentais.....	29
▪ Análise estatística.....	32
RESULTADOS.....	33
▪ Efeito da administração de diferentes concentrações.....	33
de formalina sobre o comportamento de abertura e fechamento bucal.	
▪ Efeito da administração de diferentes concentrações.....	36
de formalina sobre o comportamento de coçar a região orofacial.	

▪ Efeito da administração de diferentes concentrações.....	36
de formalina sobre o comportamento de levantar rapidamente a cabeça.	
▪ Incidência da resposta comportamental caracterizada.....	39
pelo ato de tombar a cabeça para o lado submetido a administração de formalina na região da ATM de ratos.	
▪ Avaliação das respostas comportamentais induzidas.....	40
pela administração de formalina na região da ATM de ratos através da utilização da soma das mesmas.	
▪ Efeito da co-administração de diferentes concentrações	47
de pirilamina e formalina 2,5 % sobre a soma dos comportamentos de coçar a região orofacial e levantar rapidamente a cabeça.	
▪ Efeito da co-administração de QX-314 e formalina 2,5 %	54
e da administração de morfina e formalina 2,5 % sobre a soma dos comportamentos de coçar a região orofacial e levantar rapidamente a cabeça.	
DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	56
CONCLUSÕES.....	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
ANEXO.....	78
APÊNDICE.....	79

RESUMO:

As condições dolorosas da ATM ainda são muito mal compreendidas. Como a injeção subcutânea de formalina tem sido amplamente utilizada como modelo experimental para estudar os mecanismos dolorosos, o objetivo deste trabalho foi caracterizar a resposta comportamental nociceptiva induzida pela injeção de formalina na ATM de ratos e verificar o envolvimento de mecanismos histaminérgicos periféricos nesta resposta. Para isso, NaCl 0,9 % (50 µl) ou diferentes concentrações de formalina (0,5; 1,5; 2,5 ou 5 %; 50 µl) foram administradas na região da ATM e a pirilamina (50; 100; 200 ou 400 µg; 25 µl), um antagonista seletivo do receptor histaminérgico do tipo H₁, ou NaCl 0,9 % (25 µl) foi co-administrada com a formalina 5 % (25 µl). As respostas comportamentais nociceptivas caracterizadas pelo ato de coçar a região periarticular e levantar rapidamente a cabeça foram quantificadas por 45 minutos e utilizadas conjuntamente como medida quantitativa única de dor. A administração periarticular de formalina produziu uma resposta comportamental nociceptiva estatisticamente significativa a partir da concentração de 1,5% em relação a de NaCl 0,9 %. Tal resposta foi significativamente reduzida pela co-administração de pirilamina a partir de 100 µg. Em adição, as respostas foram significativamente reduzidas pela co-administração de QX-314 2 % e formalina e pela administração

intraperitoneal de morfina (4mg/kg; 10ml/kg). Os resultados indicaram que a administração de formalina na ATM de ratos produz respostas comportamentais nociceptivas quantificáveis, constituindo um novo modelo experimental de dor na ATM, e evidenciaram o envolvimento da histamina endógena através da ativação do receptor histaminérgico periférico do tipo H_1 nesta resposta.

ABSTRACT:

The TMJ pain conditions are poorly understood. Considering that the subcutaneous formalin injection has been widely used as an experimental model for studying pain mechanisms, the aim of this study was to characterize the nociceptive behavioral responses induced by the formalin injection into the TMJ region of rats and verify the role of the peripheral H₁ histaminergic receptor in this response. For this, NaCl 0.9 % (50 µl) or different concentrations of formalin (0.5, 1.5, 2.5 or 5 %) was administrated into the TMJ region and pyrilamine (50, 100, 200 or 400 µg; 25 µl), a selective H₁ receptor antagonist, or NaCl 0.9 % (25 µl) was co-administrated with formalin 5 % (25 µl). The nociceptive behavioral responses characterized by rubbing the periarticular region and shaking the head quickly were quantified for 45 minutes and taken together as a quantitative nociceptive behavioral measure. The formalin injection into the TMJ region produced significant nociceptive behavioral responses from the concentration of 1.5 % when compared to the NaCl 0.9% injection. These responses were significantly reduced by the co-administration of pyrilamine from the concentration of 100 µg. In addition, these responses were significantly reduced too by the co-administration of QX-314 2 % and formalin into the TMJ region and by the intraperitoneal morphin administration (4mg/kg; 10ml/kg). This study demonstrates that the formalin

injection into the TMJ region of rats produces quantitative nociceptive behaviors constituting a new behavioral model of TMJ pain. The data provide evidence that the endogenous histamine acting via peripheral H₁ histamine receptor subtype plays an important role in these formalin-induced nociceptive behavioral responses.

INTRODUÇÃO:

A dor constitui o principal motivo pelo qual um paciente procura tratamento médico e odontológico. Cerca de 15 a 20% da população dos países industrializados sofre de algum tipo de dor aguda e 25 a 30% de dor crônica, além disso as diferentes condições dolorosas geram problemas de ordem pessoal, social e econômica para a sociedade em geral (AGHABEIGI, 1992).

As condições dolorosas temporomandibulares representam uma importante entidade clínica e comprometem a articulação temporomandibular (ATM) e/ou os músculos da mastigação. Contudo, a patogênese, o diagnóstico e o tratamento das mesmas têm gerado grandes controvérsias no meio odontológico. Assim sendo, o desenvolvimento de modelos experimentais que possibilitem o estudo dos mecanismos fisiológicos envolvidos neste tipo específico de condições dolorosas são de grande relevância.

Os mecanismos neurais e farmacológicos da dor podem ser estudados por diferentes métodos de quantificação de dor, após a administração de uma substância irritante em animais laboratoriais. Dentre os métodos utilizados incluem-se o eletrofisiológico, que consiste no registro da atividade neuronal, o eletromiográfico, no qual realiza-se o registro da atividade muscular, e o comportamental. O método comportamental corresponde àquele no qual um tratamento como estimulação elétrica ou drogas é aplicado no animal acordado para

examinar as variáveis comportamentais do mesmo. Ao contrário dos métodos eletrofisiológico e eletromiográfico, é o único que permite uma análise resultante da integração do sistema nervoso central como um todo.

A administração subcutânea de formalina diluída tem sido amplamente utilizada como modelo experimental para estudar os mecanismos dolorosos. Uma vez administrada, a formalina desencadeia uma resposta dolorosa difusa de longa duração, sensível a várias classes de drogas analgésicas.

A aplicação de formalina na pata traseira de rato (HUNSKAAR & HOLE, 1987; CODERRE *et al.*, 1990; ROSLAND, 1990) assim como na região perioral (CLAVELOU *et al.*, 1989; 1995) produz uma resposta de padrão bifásico observada por métodos comportamental (CADET *et al.*, 1995) e eletrofisiológico (RABOISSON *et al.*, 1995). A primeira fase da resposta ocorre logo após a administração da formalina e dura aproximadamente 5 minutos. A segunda fase inicia-se aproximadamente 15 minutos após a administração da formalina e dura aproximadamente 45 minutos, e é separada da primeira por um período de relativa inatividade denominado de interfase (DUBUISSON & DENNIS, 1977).

Tem sido proposto que a primeira fase do teste da formalina parece estar relacionada com a estimulação química direta dos nociceptores, enquanto que a segunda fase estaria relacionada com a reação inflamatória decorrente da injúria do tecido (DUBUISSON & DENNIS, 1977; HUNSKAAR & HOLE, 1987) e com o processo de sensibilização central (CODERRE *et al.*, 1990). No entanto, pode-se

constatar que os experimentos que utilizam o teste da formalina como modelo de dor inflamatória e sensibilização central apresentam dados conflitantes.

Não obstante a importância da sensibilização central nas respostas comportamentais desencadeadas pela injeção da formalina, tem sido demonstrado que o componente periférico também participa da segunda fase de respostas do teste da formalina, uma vez que a injeção local de um derivado quaternário da lidocaina hidrofílica após a primeira fase, inibe a segunda (TAYLOR *et al.*, 1995).

Dados obtidos recentemente por nosso grupo (PARADA *et al.*, 1999) não só confirmam a importância do componente periférico na segunda fase do teste da formalina como demonstram o importante papel da histamina endógena na gênese da segunda fase da resposta comportamental nociceptiva induzida pela mesma.

Em adição, encontra-se documentado na literatura o fato dos receptores de histamina do tipo H₁ localizados nas terminações nervosas participarem do processo de sensibilização periférica (MALBERG-AIELLO *et al.*, 1998). Também é conhecido que os antagonistas dos receptores H₁ apresentam efeito anti-nociceptivo (RUMORE & SCHLICHTING, 1985; LAMBERTI *et al.*, 1996).

As dores orofaciais destacam-se das demais dores somáticas não só em função da sua grande intensidade e frequência de ocorrência (AGHABEIGI, 1992) como também pela via de condução da informação dolorosa. A via trigeminal difere

acentuadamente da via de condução da informação dolorosa proveniente das demais regiões somáticas (DUBNER, 1986).

Um dado que tem constantemente chamado a atenção nos trabalhos que envolvem o trato espinhal do trigêmeo é a resposta no lado contralateral ao da aplicação dos estímulos nociceptivos. Tem sido demonstrado que a aplicação de óleo de mostarda na ATM de ratos desencadeia uma resposta nociceptiva reflexa-flexora nos músculos digástricos e masséteres ipsi- e contralaterais (TAMBELI *et al.*, 1997), promove a liberação de glutamato e aspartato no subnúcleo caudal e interpolar de ambos os lados (BEREITER & BENETTI, 1996), além de induzir bilateralmente a expressão do gene c-fos em vários núcleos do tronco encefálico (HATHAWAY *et al.*, 1995). Entretanto, a aplicação de formalina na pata traseira de ratos desencadeia um comportamento nociceptivo ipsilateral à aplicação, mas não contralateral (DUBUISSON & DENNIS, 1987; ROSLAND *et al.*, 1990; CODERRE *et al.*, 1990; TAYLOR *et al.*, 1995). Tais particularidades do sistema trigeminal evidenciam a necessidade de investigar as condições dolorosas orofaciais, independentemente de dados obtidos em estudos realizados em outras regiões do corpo.

Considerando-se que o óleo de mostarda não tem sido utilizado em modelos comportamentais de dor espontânea, a adaptação do teste da formalina para a região orofacial constitui uma opção muito oportuna para estudar as condições dolorosas orofaciais.

Na verdade, o modelo comportamental de dor orofacial induzida pela formalina já foi descrito na região orofacial (CLAVELOU *et al.*, 1989 e 1995), através da administração subcutânea de formalina na região perioral. No entanto, os efeitos desencadeados pela mesma em tecidos orofaciais profundos como a ATM não têm sido explorados.

Vale a pena ressaltar que a dor orofacial proveniente dos 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 provenientes da pele, da mucosa, da ATM, dos músculos mastigatórios, da língua, da polpa dental, do pescoço e de vasos da dura-máter. Isso explica, pelo menos em parte, a localização imprecisa dos estímulos nociceptivos provenientes dos tecidos orofaciais profundos, como observado nos casos de disfunção temporomandibular e dor miofacial (SESSLE *et al.*, 1995).

Diante disso, o objetivo deste trabalho foi:

- Desenvolver e padronizar um modelo comportamental em ratos para estudar as condições dolorosas provenientes da ATM, através da administração periarticular de diferentes concentrações de formalina;

- Verificar o envolvimento da histamina endógena e do receptor histaminérgico periférico do tipo H_1 na resposta comportamental observada no teste da formalina na ATM;
- Verificar se as respostas comportamentais induzidas pela administração de formalina na região da ATM de ratos são reduzidas por drogas como a morfina e a lidocaína.

REVISÃO DE LITERATURA:

De acordo com a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) a dor é definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada à injúria tecidual real ou potencial, ou descrita nesses termos (MERSK, 1986).

É bem conhecido na literatura que grande parte dos episódios dolorosos são desencadeados por injúria tecidual. Da mesma forma que uma cirurgia dental produz uma injúria tecidual, um abscesso periapical ou um trauma na ATM promovem uma injúria, através da destruição das células da região periapical de um dente ou da cápsula da ATM. A reação natural do organismo ao trauma é protegê-lo localmente impedindo uma destruição tecidual ainda maior e ao mesmo tempo alertar o cérebro do perigo eminente (COOPER, 1990), através da inflamação e da dor, respectivamente.

MECANISMOS BÁSICOS DA DOR OROFACIAL:

As terminações nervosas livres, que atuam como nociceptores (receptores sensíveis a estímulos nocivos) estão presentes em todos os tecidos orofaciais incluindo a pele, a mucosa oral, a ATM, o periodonto, a polpa dental, o periosteio e os músculos. Os nociceptores podem ser excitados por estímulos

nocivos mecânicos, térmicos, químicos ou elétricos e os impulsos nervosos gerados são transmitidos por fibras nociceptivas, cujo corpo celular se localiza no gânglio trigeminal. As fibras aferentes que conduzem a informação nociceptiva correspondem às fibras C, que são fibras de pequeno calibre (0,3 a 3 μm) amielinizadas de velocidade de condução de 0,5 a 2 m/s e às fibras A-delta, de 2 a 5 μm de diâmetro, mielinizadas com velocidade de condução de 5 a 30 m/s (AGHABEIGI, 1992). Essas fibras penetram no sistema nervoso central pela ponte e fazem sinapse com neurônios localizados no núcleo do trato espinhal do trigêmeo, que é subdividido em subnúcleo oral, subnúcleo interpolar e subnúcleo caudal (SESSLE, 1995).

O subnúcleo caudal, como o próprio nome sugere, está localizado na parte mais inferior do núcleo do trato espinhal do trigêmeo. Ele estende-se até a medula espinhal, onde se funde com o corno dorsal da mesma e tem sido considerado a principal estação de transmissão da informação nociceptiva proveniente da região orofacial (HU *et al.*, 1997), uma vez que apresenta muitas características funcionais e morfológicas similares às dos neurônios do corno dorsal da medula espinhal (DUBNER, 1986), os quais são fundamentais na transmissão da informação nociceptiva da região de tronco e membros. O subnúcleo caudal possui dois tipos de neurônios nociceptivos: os nociceptivos específicos, que respondem somente a estímulos nocivos, e os convergentes ou

multirreceptivos, que respondem tanto a estímulos mecânicos como a estímulos nocivos (YU *et al.*, 1993).

Os neurônios nociceptivos do subnúcleo caudal parecem apresentar uma extensiva convergência de fibras nervosas aferentes, sendo elas provenientes da pele, da mucosa, da ATM, dos músculos mastigatórios, da língua e da dura-máter. Essa convergência explicaria, pelo menos em parte, a localização imprecisa de estímulos nocivos profundos e a dor referida freqüentemente associada a esses tecidos (HU *et al.*, 1994).

Além do subnúcleo caudal apresentar um papel crucial na transmissão da informação nociceptiva dos tecidos craniofaciais profundos, ele está criticamente envolvido na expressão de respostas reflexas nociceptivas. Através das conexões dos neurônios do subnúcleo caudal com centros reflexos do tronco cerebral, os impulsos nociceptivos provenientes da ATM podem resultar numa contração simultânea dos músculos agonistas e antagonistas da mastigação o que serviria para limitar o movimento em condições patofisiológicas que afetam a ATM e/ou musculatura mastigatória (HU *et al.*, 1997).

Além do subnúcleo caudal, o subnúcleo interpolar também parece estar envolvido no processamento da informação nociceptiva proveniente da região orofacial. É conhecido que aminoácidos excitatórios participam do processamento da informação nociceptiva no sistema nervoso central. BEREITER & BENETTI

(1996), propuseram um estudo usando o método de microdiálise para acessar mudanças agudas na concentração extracelular de aminoácidos excitatórios de amostras coletadas da região de transição entre o subnúcleo interpolar e o subnúcleo caudal, ou próximo a ela, depois da injeção do estimulante seletivo de fibras C, óleo de mostarda, na região da ATM de ratos anestesiados. Tal injeção causou uma liberação aguda de glutamato e aspartato dentro do pólo ventrolateral da região de transição do subnúcleo interpolar e subnúcleo caudal.

Considerando que a expressão da proteína Fos pode ser utilizada para examinar áreas que recebem impulsos sensoriais nocivos, tem sido demonstrado que a estimulação química nociva da ATM de rato promove uma distribuição da imunorreatividade da proteína Fos na porção caudal do tronco cerebral, do complexo trigeminal sensorial, no subnúcleo caudal e nas porções caudais do subnúcleo interpolar (HATHAWAY *et al.*, 1995).

O subnúcleo oral, localizado na parte mais rostral do núcleo do trato espinhal do trigêmeo, também representa um elemento importante no processamento da dor orofacial, e pode estar especialmente envolvido nos mecanismos nociceptivos intra-orais e periorais (SESSLE, 1995). Apesar de ser desprovido de substância gelatinosa, o subnúcleo oral contém neurônios que exibem o fenômeno “win-up”, semelhante ao fenômeno que ocorre no corno dorsal da medula espinhal (PARADA *et al.*, 1997). O fenômeno do wind-up é uma propriedade dos neurônios convergentes e consiste num aumento gradual nas

respostas da fibra C provocado após aplicação de estimulação elétrica repetitiva de baixa frequência e alta intensidade.

Estudos eletrofisiológicos têm demonstrado 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 o subnúcleo oral (RABOISSON *et al.*, 1995).

Do tronco cerebral a informação nociceptiva proveniente da região orofacial é conduzida para o tálamo e daí para o córtex cerebral. A projeção espinotalâmica ao tálamo ventrobasal e sua projeção ao córtex somatossensorial são responsáveis pelo componente sensorial discriminativo da dor, enquanto que, as fibras nervosas que se projetam para o tálamo medial e deste para o córtex frontal estão relacionadas com o componente afetivo da dor (AGHABEIGI, 1992).

A dor é sobretudo um mecanismo de proteção do organismo que ocorre quando um tecido é lesado. No entanto, existem mecanismos responsáveis pela intensificação da dor que, em determinadas circunstâncias, fazem com que ela deixe de ser um sinal de alerta para se tornar uma patologia (CODERRE *et al.*, 1993).

O trauma ou a inflamação tecidual promovem a liberação de uma série de substâncias neuroquímicas nos tecidos, como a bradicinina proveniente dos vasos lesados, íons potássio das células rompidas, prostaglandinas que são liberadas através de uma cascata de reações, histamina e serotonina dos mastócitos, serotonina das plaquetas e substância P dos terminais axônicos. A liberação e a difusão dessas substâncias excitam e sensibilizam os aferentes primários nociceptivos e são responsáveis pela irradiação da dor a partir do sítio da injúria e a subsequente inflamação do tecido subjacente, processo conhecido como sensibilização periférica (HU *et al.*, 1994). A sensibilização periférica é responsável pela hiperalgesia, que é o aumento da sensibilidade a estímulos nocivos, e pela alodínea, uma resposta dolorosa provocada por estímulo não-nocivo (HU *et al.*, 1994; CODERRE *et al.*, 1993). Um mecanismo similar pode ocorrer no sistema nervoso central, onde um aumento na liberação de mediadores químicos na sinapse entre as fibras periféricas e os neurônios do subnúcleo caudal, ou do corno dorsal da medula espinhal, pode causar um aumento da excitabilidade e do campo receptivo desses neurônios, uma diminuição no limiar a estímulos mecânicos e um aumento da atividade espontânea, constituindo o processo conhecido como sensibilização central (DUBNER & RUDA, 1992; HU *et al.*, 1994; SESSLE, 1995).

Esse processo de sensibilização central pode ser produzido por injúria ou inflamação de tecidos profundos ou viscerais e está relacionado à hiperalgesia

secundária e manifestações de dor difusa e referida associadas à injúria ou à inflamação de tecidos profundos (HU *et al.*, 1994).

A aplicação de um agente irritante inflamatório na periferia pode induzir considerável neuroplasticidade funcional nas propriedades dos campos mecanorreceptivos cutâneos e profundos dos neurônios nociceptivos do subnúcleo caudal trigeminal, no entanto os impulsos profundos são especialmente efetivos em provocar estas mudanças neuroplásticas (YU *et al.*, 1993).

O aumento na atividade neuronal em resposta à injúria tecidual pode levar a mudanças na expressão genética e a mudanças prolongadas no sistema nervoso. Estas mudanças funcionais parecem contribuir para o processo de hiperalgesia e dor espontânea associadas à injúria tecidual. Segundo DUBNER & RUDA, 1992, a indução de processo inflamatório na pata traseira de rato promove um aumento na expressão do RNAm da pró-dinorfina na medula espinhal e paralelamente uma hiperalgesia comportamental associada à inflamação. Diante disso, os autores propõem um modelo no qual a dinorfina, a substância P e o gene relacionado da calcitonina aumentam a excitabilidade dos receptores NMDA promovendo hiperexcitabilidade neuronal e conseqüente despolarização excessiva e excitotoxicidade.

A administração de óleo de mostarda, um agente inflamatório e estimulante de fibras nervosas do tipo C, na ATM de ratos produz uma resposta

inflamatória aguda caracterizada por edema e infiltração de neutrófilos polimorfonucleares (HASS *et al.*, 1992).

As respostas dolorosas associadas a esse processo inflamatório agudo têm sido estudadas através de técnicas eletromiográficas, uma vez que a administração de óleo de mostarda na ATM produz respostas reflexas nos músculos da mastigação caracterizadas pela co-ativação dos músculos digástrico e masséter (YU *et al.*, 1994; TAMBELI *et al.*, 1997).

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

O TESTE DA FORMALINA:

O teste da formalina em ratos tem sido considerado um modelo de nocicepção válido e seguro, além de sensível à várias classes de drogas analgésicas. O estímulo nocivo desse modelo de nocicepção corresponde a uma injeção de formaldeído diluído em salina (formalina) administrada sob a pele da porção dorsal da pata traseira (DUBUISSON & DENNIS, 1977).

A resposta comportamental ao estímulo nocivo causado pela injeção de formalina na pata é quantificada pelo período de tempo que o animal lambe a pata e o número de vezes que o animal levanta rapidamente a pata injetada (DUBUISSON

& DENNIS, 1977). Dois períodos distintos de alta atividade de resposta podem ser identificados, uma fase inicial breve de dor intensa que ocorre durante os 5 primeiros minutos e uma fase tardia tônica de dor moderada que ocorre de 20 a 30 minutos após a injeção (ROSLAND, 1990). Entre a primeira e a segunda fase ocorre um período de relativa inatividade denominado de interfase.

Com relação aos mecanismos responsáveis pela primeira e segunda fase do teste da formalina, tem sido sugerido que a primeira fase é decorrente da estimulação direta de nociceptores e que a segunda fase poderia ser causada por impulsos aferentes provocados por inflamação local (HUNSKAAR & HOLE, 1987).

Tem sido proposto também que a segunda fase parece ser dependente de modificações no sistema nervoso central induzidas pela atividade neural gerada durante a primeira fase (CODERRE *et al.*, 1990), uma vez que, a administração local de bupivacaína ou intratecal de lidocaína inibe as respostas comportamentais causadas pela injeção de formalina na pata, se realizada 5 minutos antes da administração de formalina, mas não 25 minutos após. Tem sido proposto que os aminoácidos excitatórios (CODERRE & MELZACK, 1992), assim como a substância P (MJELLEM-JOLY *et al.*, 1992) contribuiriam para o desenvolvimento do processo de sensibilização central e nocicepção persistente em resposta à injeção subcutânea de formalina na pata.

Por outro lado, a sensibilização central, produzida pelos impulsos da primeira fase da formalina, pode não ser suficiente para manter as respostas comportamentais nociceptivas na segunda fase. TAYLOR *et al.*, 1995, verificaram que a administração local de um derivado quaternário da lidocaína hidrofílica 10 minutos após a administração de formalina na pata, inibe a segunda fase de repostas, o que sugere a participação do componente periférico.

Em adição, a importância do componente periférico na segunda fase do teste foi verificado recentemente por PARADA *et al.* (1999). O trabalho realizado pelos autores sugere o envolvimento da histamina na segunda fase de respostas induzidas pela administração de formalina na pata traseira de ratos, uma vez que, a co-administração do antagonista seletivo do receptor histaminérgico do tipo H₁, pirilamina, com a formalina diminui significativamente a resposta comportamental caracterizada pela elevação rápida da pata injetada.

Por ser um teste comportamental o teste da formalina apresenta variáveis como espécie, sexo, idade do animal, estresse, temperatura ambiente, que devem ser rigorosamente controladas para que os resultados obtidos sejam confiáveis. A temperatura ambiente exerce uma influência conflitiva na resposta nociceptiva. A primeira fase parece não sofrer esse efeito, por outro lado, a resposta nociceptiva da segunda fase pode ser muito menor se a temperatura for diminuída de 25°C a 20°C. A intensidade e a duração da resposta aumentam com a elevação da temperatura ambiente de 20°C para 28°C (ROSLAND, 1991).

Em 1989 CLAVELOU *et al.*, propuseram uma modificação no teste da formalina para estudar os mecanismos dolorosos provenientes da região orofacial de rato. Para isso, uma solução diluída de formalina era administrada subcutaneamente no lábio superior e a resposta comportamental nociceptiva caracterizada pelo ato de coçar a região orofacial era registrada. Dois períodos distintos de atividade intensa caracterizada pelo ato de coçar a região orofacial foram identificados: uma fase inicial entre 0 a 3 minutos imediatamente após a injeção e uma fase tardia entre 18 a 42 minutos após a injeção. Em 1995, através da utilização de diferentes concentrações de formalina, os mesmos autores verificaram que o teste orofacial da formalina poderia ser realizado utilizando-se concentrações entre 0,5 e 2,5 % e que os sinais histológicos de inflamação e injúria tecidual induzidos pela mesma se agravavam com o aumento da concentração de formalina.

O modelo orofacial do teste da formalina também tem sido utilizado para estudar o processo de sensibilização central. CADET *et al.*, 1993, demonstraram que uma única injeção de formalina na região perioral de rato pode promover uma hiperalgesia prolongada dependente de impulsos nociceptivos iniciais de curta duração que poderiam induzir a uma sensibilização central. Posteriormente (1995), os mesmos autores demonstraram que a aplicação de um estímulo condicionador caracterizado pela administração de formalina em alta concentração (10%) no lábio superior esquerdo de rato pode induzir de 1 a 2 semanas após, um aumento na resposta nociceptiva desencadeada por uma injeção

de formalina (5%) no lábio contralateral. Considerando-se que as modificações observadas em 1 semana poderiam ser suprimidas por uma anestesia do nervo infraorbital realizada antes da aplicação de estímulo condicionador, os autores propuseram que o estímulo inicial deveria ser necessário para desencadear o processo de sensibilização central.

O envolvimento dos aminoácidos excitatórios no processo de sensibilização central também tem sido demonstrado através da utilização do modelo orofacial do teste da formalina (EISENBERG, *et al.* 1993).

Por outro lado, tem sido proposto que a segunda fase de respostas do teste da formalina no lábio não pode ser mediada apenas pela sensibilização central. Com o intuito de verificar se a segunda fase da resposta era causada pela ativação de fibras aferentes e/ou por uma facilitação central induzida pela atividade neural que ocorre durante a primeira fase, DALLEL *et al.*, 1995, realizaram a administração local de lidocaína 5 minutos antes ou 9 minutos após a injeção de formalina no lábio superior de ratos e verificaram que a primeira e a segunda fase da resposta nociceptiva da formalina dependeriam da ativação de aferentes primários (componente periférico).

Tem sido demonstrado que a estimulação nociva da face de rato provoca exacerbação no ato de coçar a região orofacial (CLAVELOU *et al.*, 1989). A relação entre dor facial unilateral e o ato de coçar assimetricamente a face foi estudada em ratos normais intactos por VOS *et al.*, em 1998. Os autores verificaram

que, ao contrário dos distúrbios sensoriais não-dolorosos induzidos experimentalmente no território do nervo infraorbital, a estimulação facial nociva caracterizada pela injeção de formalina subcutânea promovia uma exacerbação no ato de coçar a área afetada, sugerindo que o ato de coçar a face de forma assimétrica e prolongada pode ser usado como um sinal de dor facial unilateral.

Curiosamente, ao investigar uma possível correlação entre as respostas comportamentais nociceptivas induzidas pela injeção de formalina em diferentes regiões do corpo em ratos, CADET *et al.*, em 1998, verificaram uma correlação significativa entre o ato de coçar a região orofacial e o de lambar a pata.

Os métodos de quantificação das respostas comportamentais observadas no teste da formalina têm limitações inerentes, que incluem a subjetividade do observador e as potenciais interações entre os comportamentos. Autores como WHEELER-ACETO & COWAN, 1993, sugerem que uma inesperada diminuição em um único índice nociceptivo como lambar ou elevar rapidamente a pata injetada pode ser um critério inadequado para demonstrar antinocicepção. Outros como ABBOTT *et al.*, 1995, têm demonstrado que a simples soma do período de tempo que o animal permanece lambendo e elevando a pata, ou que a realização de um score de dor, onde se daria pesos diferentes para cada comportamento, correspondem a medidas superiores à qualquer medida comportamental isolada.

O SISTEMA HISTAMINÉRGICO:

O sistema histaminérgico tem ganhado grande importância nos últimos anos, após a definição anatômica das vias histaminérgicas e a identificação de três classes de receptores da histamina no sistema nervoso (H₁, H₂ e H₃). Tem sido descrito que a histamina produz efeitos centrais, dentre os quais a antinocicepção. Quando injetada intracerebroventricularmente (ICV) a histamina tem efeitos anti-nociceptivo ou hipernociceptivo, dependendo da região do cérebro em que for injetada ou da dose administrada. Estes efeitos opostos observados com o aumento das doses ICV poderiam ser devidos a uma ação em receptores pré- ou pós-sinápticos. Contudo, ainda não estaria bem esclarecido qual dos receptores pós-sinápticos estaria envolvido no efeito anti-nociceptivo da histamina (LAMBERTI *et al.*, 1996).

Considerando-se que as vias histaminérgicas e serotoninérgicas centrais parecem estar envolvidas no processo de nocicepção, drogas anti-histamínicas poderiam modular as respostas nociceptivas. No entanto, a possibilidade de envolvimento de outras vias ainda não propostas não pode ser descartada, pois um maior entendimento dos mecanismos nociceptivos é necessário para uma melhor elucidação do papel dos anti-histamínicos na analgesia (RUMORE & SCHILICHTING, 1985).

Além da função de neurotransmissor no sistema nervoso central, a histamina participa do processo de sensibilização periférica através da estimulação de nociceptores (RUMORE & SCHILICHTING, 1985). Quando liberada na epiderme, a histamina provoca prurido, enquanto que, na derme, sua liberação provoca dor. Na periferia, os receptores neuronais da histamina são geralmente do tipo H_1 .

A histamina possui um importante papel em diversos processos imunológicos e patológicos, como, por exemplo, no desenvolvimento de edema (GUO *et al.*, 1997). Os mastócitos do tecido conjuntivo são a maior fonte de histamina. A desgranulação dos mastócitos pode ser causada por um antígeno mediado via imunoglobulina E e por secretagogos como a substância P, a neuroquinina A e o ATP extracelular, os quais promovem a liberação rápida e acentuada de histamina e também de serotonina (RUMORE & SCHILICHTING, 1985; GUO *et al.*, 1997).

A literatura fornece evidências de que muitos anti-histamínicos atuam como agentes analgésicos e muitos como adjuvantes de analgésicos. Alguns anti-histamínicos, como a pirilamina, considerada o antagonista mais seletivo do receptor H_1 , têm sua efetividade registrada como agente antinociceptivo (MALMBERG-AIELLO *et al.*, 1998). Na verdade, tem sido considerado que os anti-histamínicos antagonistas do receptor H_1 , em especial, possuem ação analgésica (LAMBERTI *et al.*, 1996).

Dados obtidos através de avaliações comportamentais realizadas em camundongos mutantes com falta de receptores H_1 (YACAI et al., 1998) reforçam os dados farmacológicos prévios que indicam que a histamina modula várias funções fisiológicas como atividade locomotora, emoção, memória e aprendizado, comportamento agressivo e nocicepção, através dos receptores H_1 .

Os anti-histamínicos H_1 são conhecidos por bloquear não apenas os receptores H_1 , como também os receptores muscarínicos, serotoninérgicos e os sistemas de recaptção das moaminas. Contudo, os sistemas opióides, catecolaminérgico, serotoninérgico e colinérgico não parecem estar envolvidos nos efeitos antinociceptivos produzidos por anti-histamínicos H_1 , já que moléculas específicas que interferem com estes sistemas não são capazes de prevenir as respostas antinociceptivas induzidas pelos anti-histamínicos H_1 . A ativação do receptor H_1 aumenta a sensibilidade a estímulos nocivos (MALMBERG-AIELLO *et al.*, 1998).

MATERIAIS E MÉTODOS:

1. Animais:

Para realização deste trabalho foram utilizados 112 ratos machos Wistar pesando entre 150 a 250 g, provenientes do Biotério da FOP-Unicamp.

Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas (5 por gaiola) contendo maravilha, em ambiente com controle de luminosidade (ciclos claro/escuro de 12hs) com alimentação e água, *ad libitum*. As sessões de teste foram realizadas durante a fase clara entre 09:00 e 17:00 hs em sala silenciosa, com temperatura ambiente mantida a 25°C (ROSLAND, 1991). Durante o teste os ratos não tiveram acesso à água ou à comida. Os animais foram manipulados por um período de 7 dias antes dos procedimentos experimentais pelo pesquisador.

A experimentação animal seguiu as diretrizes propostas pelo comitê para Pesquisa e Ética da Associação Internacional para Estudo da Dor (IASP, 1983) em animais conscientes . Em particular, a duração dos experimentos foi a menor possível e o número de ratos usados foi mantido ao mínimo necessário.

2. Teste Comportamental:

Para a realização das análises comportamentais uma câmara de observação com base e 3 laterais espelhadas e frente de vidro medindo 30x30x30

cm foi utilizada. Cada animal foi inicialmente colocado e mantido na câmara por 10 minutos para habituar-se ao ambiente de experimentação e minimizar o estresse.

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

Como procedimento de rotina, o sítio de aplicação da formalina era confirmado pós-morte através do indicador de edema, caracterizado pelo extravasamento plasmático do corante Azul de Evans administrado na concentração de 0,1% (5 mg/kg) endovenosamente 10 minutos antes do animal ser anestesiado com éter e perfundido com salina. Como o corante Azul de Evans se liga às proteínas plasmáticas (HASS *et al.*, 1991), o local da injeção era identificado visualmente, de acordo com a aparência do corante extravasado.

3. Soluções utilizadas:

- Salina (NaCl 0,9 %).
- Formalina, solução aquosa de formaldeído a 37 % disponível comercialmente (Sigma) diluída em salina isotônica nas concentrações de 0,5; 1,5; 2,5 e 5 %.

- Pirilamina, um antagonista seletivo do receptor histaminérgico do tipo H₁ (Sigma) nas concentrações de 50; 100; 200 e 400 µg.
- Sulfato de morfina diluído em salina na dose de 4 mg/kg (10 ml/kg).
- QX-314, um derivado quaternário da lidocaína hidrofílica, diluído em salina na concentração de 2%.

4. Grupos Experimentais:

Os animais foram divididos aleatoriamente em diferentes grupos experimentais.

Nos experimentos iniciais os animais receberam uma injeção na região da ATM esquerda (50 µl) de salina (GRUPO I; n=10) ou de diferentes concentrações de formalina (0,5 % GRUPO II, n=10; 1,5 % GRUPO III, n=10; 2,5 % GRUPO IV, n=10; 5 % GRUPO V, n=10).

Após a injeção periarticular o animal foi recolocado na câmara de observação e as respostas comportamentais caracterizadas pelo movimento de abertura e fechamento bucal, pelo ato de coçar a região injetada com a pata dianteira ou traseira, pelo ato de levantar rapidamente a cabeça e tombar a cabeça para o lado injetado foram quantificadas separadamente por um período total de 45 minutos, dividido em 15 blocos de 3 minutos. Para isso, o período de tempo que o animal permanecia abrindo e fechando a boca ou coçando a região injetada foi registrado simultaneamente através da utilização de dois cronômetros, o número de vezes que

o animal levantava a cabeça foi quantificado por um contador de células e a incidência do comportamento de tombar a cabeça foi avaliada nos diferentes grupos experimentais.

Em outros dois grupos observou-se o comportamento dos animais normais, sem a aplicação de nenhum tipo de tratamento (GRUPO VI, n=5), e o comportamento dos animais após a simples introdução da agulha na região periarticular (GRUPO VII, n=5). As respostas comportamentais apresentadas foram comparadas àquelas dos animais que receberam salina.

Após a padronização das respostas comportamentais induzidas pela administração da formalina na região da ATM, o antagonista seletivo do receptor histaminérgico do tipo H_1 , a pirilamina, foi co-administrada (25 μ l, n=8) com a formalina (5 %; 25 μ l) em diferentes concentrações (50 μ g, GRUPO VIII; 100 μ g, GRUPO IX; 200 μ g, GRUPO X; 400 μ g, GRUPO XI). Com o objetivo de investigar um possível efeito sistêmico da pirilamina, esta foi administrada (400 μ g; 50 μ l, GRUPO XIV, n=8) na região da ATM contralateral à da administração de formalina (2,5 %; 50 μ l).

Com o intuito de confirmar o caráter nociceptivo das respostas comportamentais induzidas pela administração de formalina na região da ATM de ratos, foram realizados dois grupos experimentais adicionais, nos quais o QX-314 2 % (25 μ l) foi co-administrado com a formalina 5 % (25 μ l) na região da ATM

(GRUPO XII, n=6) e a morfina foi administrada intraperitonealmente 30 minutos antes da administração de formalina 2,5 % (50 µl) na região da ATM (GRUPO XIII, n=6).

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

Os comportamentos nociceptivos induzidos pela administração de formalina na região da ATM de ratos foram avaliados separadamente e conjuntamente pela soma do período total de tempo que os animais emitiram os comportamentos ao longo do período de observação.

ANÁLISE ESTATÍSTICA:

Os dados com homogeneidade de variância foram analisados usando teste One-Way análise de variância (ANOVA) e teste T. Comparações múltiplas foram realizadas aplicando-se o teste TUKEY. Dados sem homogeneidade de variância foram analisados aplicando-se o teste One Way Analysis of Variance on Ranks KRUSKAL-WALLIS e MANN-WHITNEY. As comparações múltiplas foram feitas pelo teste DUNN. Para a determinação da relação entre a dose e os comportamentos induzidos pela formalina, utilizou-se a CORRELAÇÃO DE SPEARMAN. Para todos os testes o nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$. Os dados estão apresentados pela Média \pm o Erro Padrão da Média e pela Mediana. O programa utilizado para a realização dos cálculos estatísticos foi o SIGMA STAT.

RESULTADOS:

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

1. Efeito da administração de diferentes concentrações de formalina sobre o comportamento de abertura e fechamento bucal:

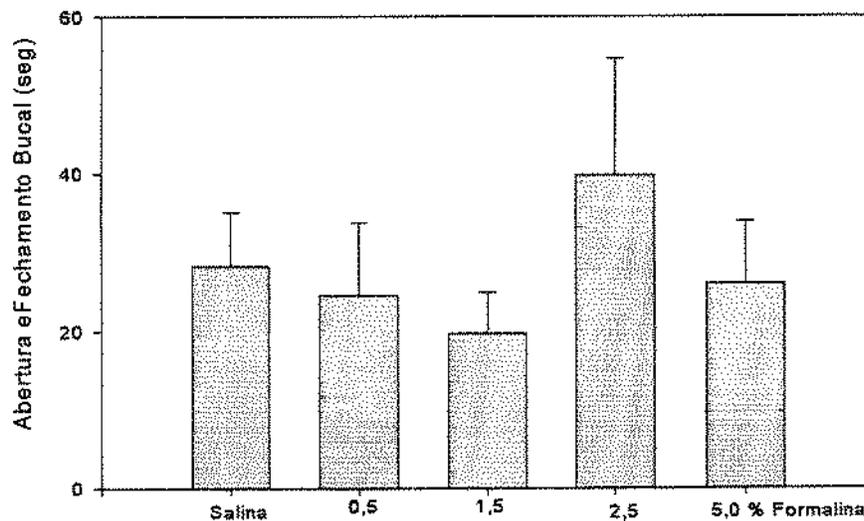
A administração de diferentes concentrações de formalina (0,5; 1,5; 2,5 ou 5 %, 50 μ l) na região da ATM de ratos não promoveu um aumento significativo ($p > 0,05$, ANOVA) no comportamento de abertura e fechamento bucal em relação à administração de salina (grupo controle, 50 μ l) (Tabela 1, Figura 1).

Os animais submetidos à administração de salina (50 μ l) na região da ATM apresentaram um aumento significativo ($p < 0,05$, teste Tukey) nesse comportamento em relação aos animais do grupo não-tratado (Tabela 2, Figura 2).

Tabela 1. Efeito da administração de diferentes concentrações de formalina na região da ATM de ratos sobre o comportamento de abertura e fechamento bucal. Os dados expressos como média±EPM correspondem à média da soma do período de tempo que os animais abriram e fecharam a boca ao longo dos 45 minutos de observação. Valores entre parênteses () indicam o número de ratos em cada grupo.

GRUPOS	MÉDIA±EPM
Salina (n=10)	28,33±6,82
Formalina 0,5 % (n=07)	24,59±9,29
Formalina 1,5 % (n=08)	19,77±5,25
Formalina 2,5 % (n=08)	39,88±14,77
Formalina 5,0 % (n=09)	26,15±7,87

p>0,05, ANOVA



Figural. Efeito da administração de diferentes concentrações de formalina na região da ATM de ratos sobre o comportamento de abertura e fechamento bucal. Cada coluna representa a média±EPM da soma do período de tempo (seg.) que os animais abriram e fecharam a boca ao longo dos 45 minutos de observação. Não houve diferença significativa entre os grupos (p>0,05, ANOVA).

Tabela 2. Caracterização do comportamento de abertura e fechamento bucal em animais não-tratados, sham e submetidos à administração de salina na região da ATM. Os dados expressos como média±EPM correspondem à média da soma do período de tempo que os animais abriram e fecharam a boca ao longo dos 45 minutos de observação. Valores entre parênteses () indicam o número de ratos em cada grupo.

GRUPOS	MÉDIA±EPM
Não-tratado (n=05)	4,35±2,29
Sham (n=05)	12,62±4,04
Salina (n=10)	28,33±6,82*

*p<0,05, teste Tukey, indica diferença significativa em relação ao grupo não-tratado.

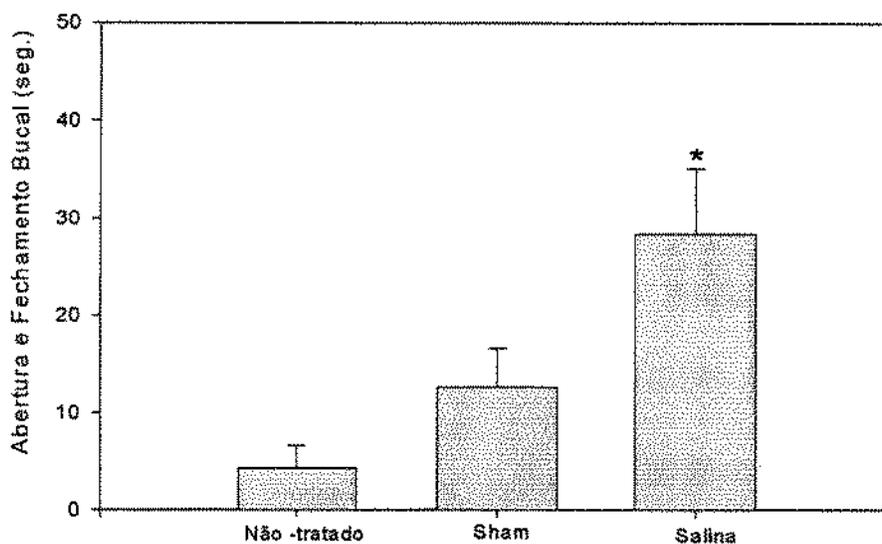


Figura 2. Caracterização do comportamento de abertura e fechamento bucal em animais não-tratados, sham e submetidos à administração de salina (50 µl) na região da ATM. Cada coluna representa a média±EPM da soma do período de tempo (seg.) que os animais abriram e fecharam a boca ao longo dos 45 minutos de observação. * p<0,05, teste Tukey, indica um aumento significativo em relação ao grupo não-tratado.

2. Efeito da administração de diferentes concentrações de formalina sobre o comportamento de coçar a região orofacial:

A administração de diferentes concentrações de formalina (0,5; 1,5; 2,5 ou 5 %, 50 µl) na região da ATM de ratos promoveu um aumento significativo no comportamento de coçar a região orofacial em relação à administração de salina (50 µl) a partir da concentração de 1,5 % (Tabela 3, Figura 3).

3. Efeito da administração de diferentes concentrações de formalina sobre o comportamento de levantar rapidamente a cabeça:

A administração de diferentes concentrações de formalina (0,5; 1,5; 2,5 ou 5 %, 50 µl) na ATM de ratos promoveu um aumento significativo ($p < 0,05$, teste Dunn) no comportamento de levantar rapidamente a cabeça em relação à administração de salina (50 µl) a partir da concentração de 1,5 % (Tabela 4, Figura 4). Dos 10 animais analisados em cada grupo foram descartados 3 do grupo 0,5 %, 2 do grupo 1,5 % e 2,5 % e 1 do grupo 5 %, uma vez que, por motivos indeterminados esses animais não apresentaram tal comportamento.

Tabela 3. Efeito da administração de diferentes concentrações de formalina na região da ATM de ratos sobre o comportamento de coçar a região orofacial. Os dados expressos como mediana correspondem à mediana da soma do período de tempo que os animais coçaram a região orofacial ao longo dos 45 minutos de observação. Valores entre parênteses () indicam o número de ratos em cada grupo.

GRUPOS	MEDIANA
Salina (n=10)	55,64
Formalina 0,5 % (n=07)	144,67
Formalina 1,5 % (n=08)	143,67 *
Formalina 2,5 % (n=08)	153,30 *
Formalina 5,0 % (n=09)	191,80 *

* $p < 0,05$, teste Dunn, indica diferença significativa em relação a salina.

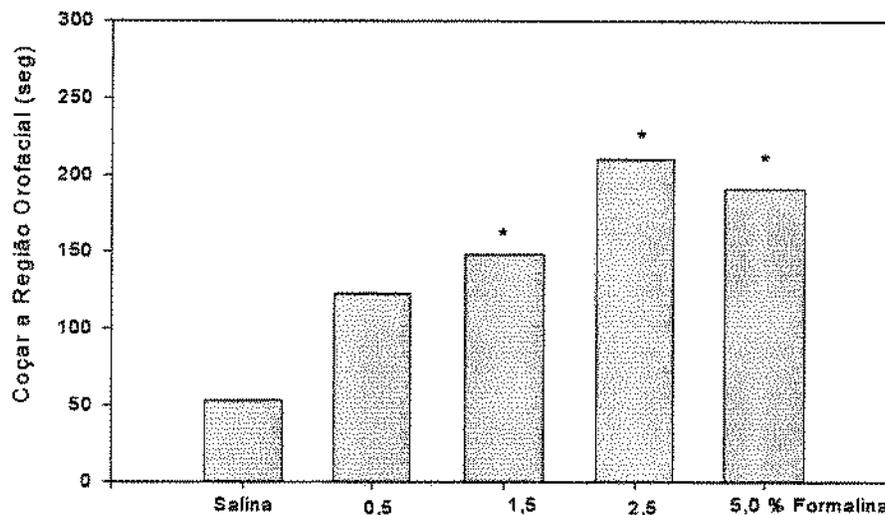


Figura 3. Efeito da administração de diferentes concentrações de formalina na região da ATM de ratos sobre o comportamento de coçar a região orofacial. Cada coluna representa a mediana da soma do período de tempo (seg.) que os animais coçaram a região orofacial ao longo dos 45 minutos de observação. * $p < 0,05$, teste Dunn, indica um aumento significativo em relação a salina.

Tabela 4. Efeito da administração de diferentes concentrações de formalina na região da ATM de ratos sobre o comportamento de levantar rapidamente a cabeça. Os dados expressos como mediana correspondem à média da soma do período de tempo que os animais levantaram rapidamente a cabeça ao longo dos 45 minutos de observação. Valores entre parênteses () indicam o número de ratos em cada grupo.

GRUPOS	MEDIANA
Salina (n=10)	0
Formalina 0,5 % (n=07)	54
Formalina 1,5 % (n=08)	94 *
Formalina 2,5 % (n=08)	105,5 *
Formalina 5,0 % (n=09)	120 *

* $p < 0,05$, teste Dunn, indica diferença significativa em relação a salina.

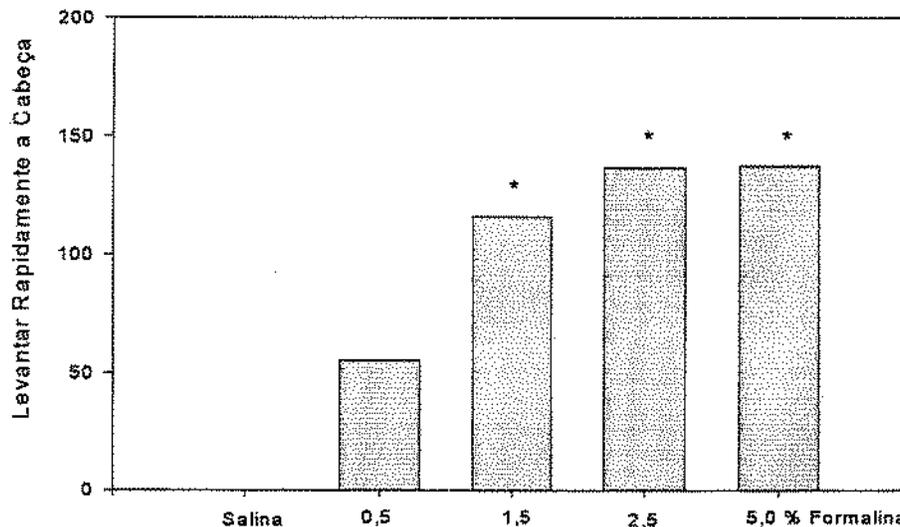


Figura 4. Efeito da administração de diferentes concentrações de formalina na região da ATM de ratos sobre o comportamento de levantar rapidamente a cabeça. Cada coluna representa a mediana da soma do número de vezes que os animais levantaram rapidamente a cabeça ao longo dos 45 minutos de observação. * $p < 0,05$, teste Dunn, indica um aumento significativo em relação a salina.

4. *Incidência da resposta comportamental caracterizada pelo ato de tombar a cabeça para o lado submetido à administração de formalina na região da ATM de ratos:*

Nenhum animal submetido à administração de salina (50 µl) na região da ATM apresentou o comportamento de tombar a cabeça para o lado injetado. Por outro lado, 100% dos animais submetidos à administração de formalina nas concentrações de 0,5, 1,5, 2,5 e 5 % apresentaram tal comportamento (Tabela 5).

Tabela 5. Incidência da resposta comportamental caracterizada pelo ato de tombar a cabeça para o lado submetido à administração de diferentes concentrações de formalina na região da ATM de ratos. Valores entre parênteses () indicam o número de ratos em cada grupo.

GRUPOS	- INCIDÊNCIA
salina (n=10)	0 %
formalina 0,5 % (n=07)	100 %
formalina 1,5 % (n=08)	100 %
formalina 2,5 % (n=08)	100 %
formalina 5,0 % (n=09)	100 %

5. Avaliação das respostas comportamentais induzidas pela administração de formalina na região da ATM de ratos através da Soma das mesmas:

Os animais que foram submetidos à administração de formalina na região da ATM apresentaram o comportamento de coçar a região orofacial e levantar rapidamente a cabeça de forma alternada, ou seja, ora coçavam, ora levantavam a cabeça. Este fato pode indicar uma complementação entre estes dois comportamentos. Com isso, os mesmos foram avaliados através da soma do período de tempo (segundos) que cada animal permaneceu coçando a região orofacial com o número total de vezes que cada animal levantou rapidamente a cabeça durante o período total de 45 minutos de observação. A Figura 5 ilustra a evolução temporal dos comportamentos de coçar a região orofacial e levantar rapidamente a cabeça induzidos pela administração de formalina 2,5 % na região da ATM de ratos, avaliados separadamente e avaliados através da soma dos mesmos.

A análise da correlação dos dados demonstrou uma correlação significativa ($p < 0,05$) entre as concentrações e a resposta comportamental induzida pela administração de formalina. A correlação foi mais forte quando os comportamentos de coçar e levantar rapidamente a cabeça foram avaliados conjuntamente através da simples soma dos mesmos do que quando avaliados separadamente (Tabela 6).

A administração de diferentes concentrações de formalina (0,5; 1,5; 2,5 ou 5 %, 50 μ l) na região da ATM de ratos promoveu um aumento significativo

($p < 0,001$, Teste Tukey) na resposta comportamental avaliada pela soma dos comportamentos de coçar a região orofacial e levantar rapidamente a cabeça em relação à administração de salina (50 μ l) a partir da concentração de 1,5 %. (Tabela 7, Figura 6).

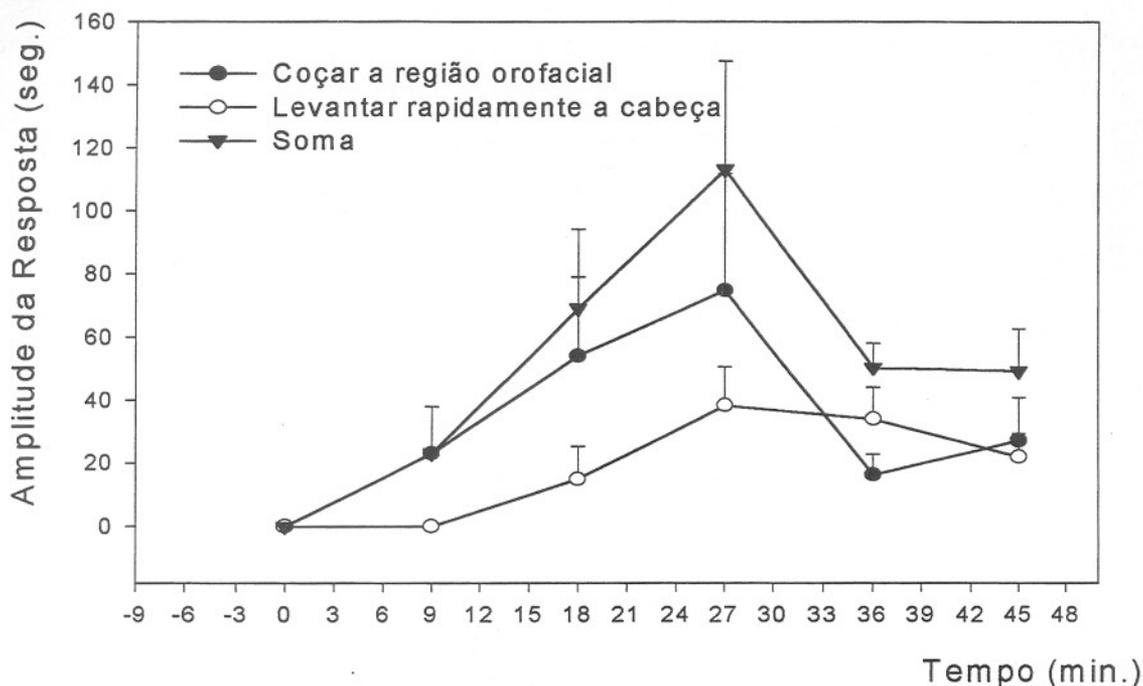


Figura 5. Evolução temporal dos comportamentos caracterizados pelos atos de coçar a região orofacial, levantar rapidamente a cabeça e pela soma dos mesmos induzidos pela administração de formalina 2,5 % na região da ATM de ratos, durante o período de observação de 45 minutos. Cada símbolo representa a soma da média de 3 blocos (9 minutos) de observação \pm EP.

Tabela 6. Correlação entre as concentrações de formalina administradas na região da ATM de ratos e as respostas comportamentais caracterizadas pelo ato de coçar a região orofacial, levantar rapidamente a cabeça e pela soma das mesmas.

<i>Resposta Comportamental</i>	Coçar a região orofacial	Levantar rapidamente a cabeça	Soma
<i>Coefficiente de Correlação</i>	0,471	0,769	0,785

Os pares de variáveis com coeficientes de correlação positivos e $p < 0,05$ tendem a aumentar juntos ($p < 0,05$, correlação de Spearman).

Tabela 7. Efeito da administração de diferentes concentrações de formalina na região da ATM de ratos sobre a resposta comportamental avaliada através da soma. Os dados expressos como média±EPM correspondem à média da soma dos comportamentos caracterizados pelos atos de coçar a região orofacial e levantar rapidamente a cabeça dos animais de cada grupo. Valores entre parênteses () indicam o número de ratos em cada grupo.

GRUPOS	MÉDIA±EPM
Salina (n=10)	53,34±5,93
Formalina 0,5 % (n=07)	177,66±15,04
Formalina 1,5 % (n=08)	263,92±35,47 *
Formalina 2,5 % (n=08)	347,17±61,33 *
Formalina 5,0 % (n=09)	328,62±36,02 *

* $p < 0,05$, teste Tukey, indica diferença significativa em relação a salina.

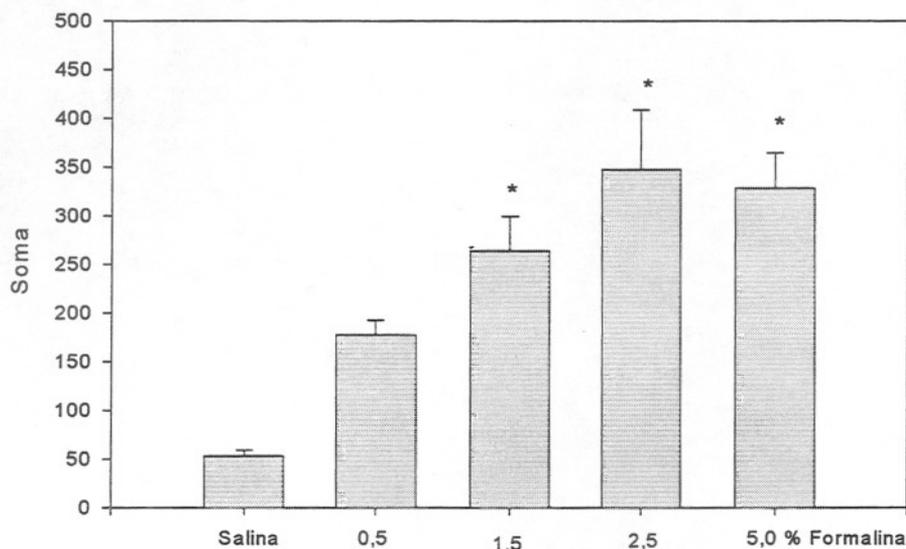


Figura 6. Efeito da administração de diferentes concentrações de formalina na região da ATM de ratos sobre a resposta comportamental avaliada através da soma. Cada coluna (média±EPM) representa a média da soma dos comportamentos caracterizados pelos atos de coçar a região orofacial e levantar rapidamente a cabeça. * $p < 0,05$, teste Tukey, indica um aumento significativo em relação a salina.

6. *Efeito da co-administração de diferentes concentrações de pirilamina e formalina 2,5 % sobre os comportamentos caracterizados pelo ato de coçar a região orofacial e levantar rapidamente a cabeça avaliados separadamente:*

A co-administração de diferentes concentrações (50; 100; 200 ou 400 μg , 25 μl) do antagonista seletivo do receptor histaminérgico do tipo H_1 , pirilamina, e formalina 5 % (25 μl) na região da ATM de ratos não promoveu uma diminuição significativa ($p > 0,05$, Kruskal-Wallis) na resposta comportamental caracterizada pelo ato de coçar a região orofacial (Tabela 8, Figura 7).

A co-administração de diferentes concentrações (50; 100; 200 ou 400 μg , 25 μl) do antagonista seletivo do receptor histaminérgico do tipo H_1 , pirilamina, e formalina 5 % (25 μl) na região da ATM de ratos promoveu uma diminuição significativa ($p < 0,05$, teste Tukey) na resposta comportamental caracterizada pelo ato de levantar rapidamente a cabeça em relação à administração de formalina 2,5 % (50 μl) a partir da concentração de 100 μg . (Tabela 9, Figura 8).

Tabela 8. Efeito da co-administração de diferentes concentrações do antagonista seletivo do receptor histaminérgico do tipo H₁, pirilamina, sobre a resposta comportamental caracterizada pelo ato de coçar a região orofacial induzida pela administração de formalina 2,5 %. Os dados expressos como mediana correspondem à mediana do comportamento caracterizado pelo ato de coçar a região orofacial. Valores entre parênteses () indicam o número de ratos em cada grupo. Controle 1 (C1) representa o grupo de animais submetidos à administração de formalina 2,5 % na região da ATM.

GRUPOS	MEDIANA
C1 (n=08)	153,30
Pirilamina 50 µg (n=08)	84,28
Pirilamina 100 µg (n=08)	65,54
Pirilamina 200 µg (n=08)	84,76
Pirilamina 400 µg (n=08)	45,99

p>0,05, Kruskal Wallis

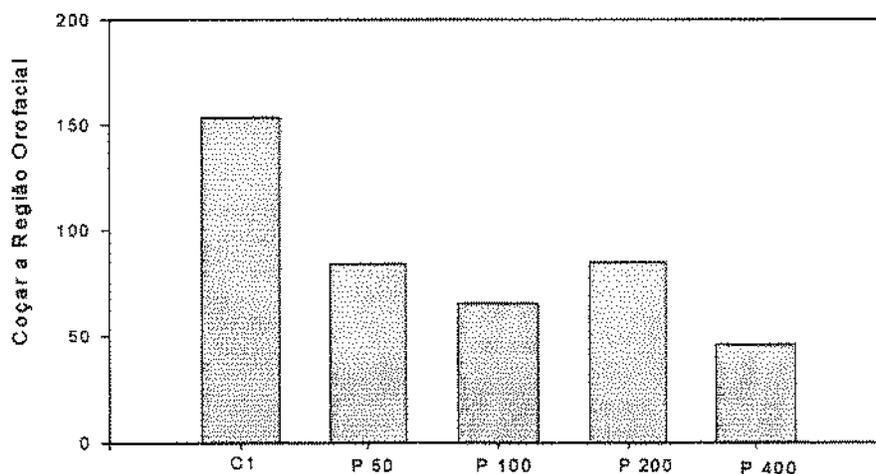


Figura 7. Efeito da co-administração de diferentes concentrações do antagonista seletivo do receptor histaminérgico do tipo H₁, pirilamina, sobre a resposta comportamental induzida pela administração de formalina 2,5 %. Cada coluna (mediana) representa a mediana do comportamento caracterizado pelo ato de coçar a região orofacial. p>0,05, Kruskal Wallis.

Tabela 9. Efeito da co-administração de diferentes concentrações do antagonista seletivo do receptor histaminérgico do tipo H_1 , pirilamina, sobre a resposta comportamental caracterizada pelo ato de levantar rapidamente a cabeça induzida pela administração de formalina 2,5 %. Os dados expressos como média±EP correspondem à média do comportamento caracterizado pelo ato de levantar rapidamente a cabeça. Valores entre parênteses () indicam o número de ratos em cada grupo. Controle 1 (C1) representa o grupo de animais submetidos à administração de formalina 2,5 % na região da ATM.

GRUPOS	MÉDIA±EP
C1 (n=08)	136,87±36,68
Pirilamina 50 µg (n=08)	55,12±20,13
Pirilamina 100 µg (n=08)	39,25±14,62
Pirilamina 200 µg (n=08)	24,12±5,99
Pirilamina 400 µg (n=08)	24,87±7,51

* $p < 0,05$, teste Tukey, indica diferença significativa em relação a C1.

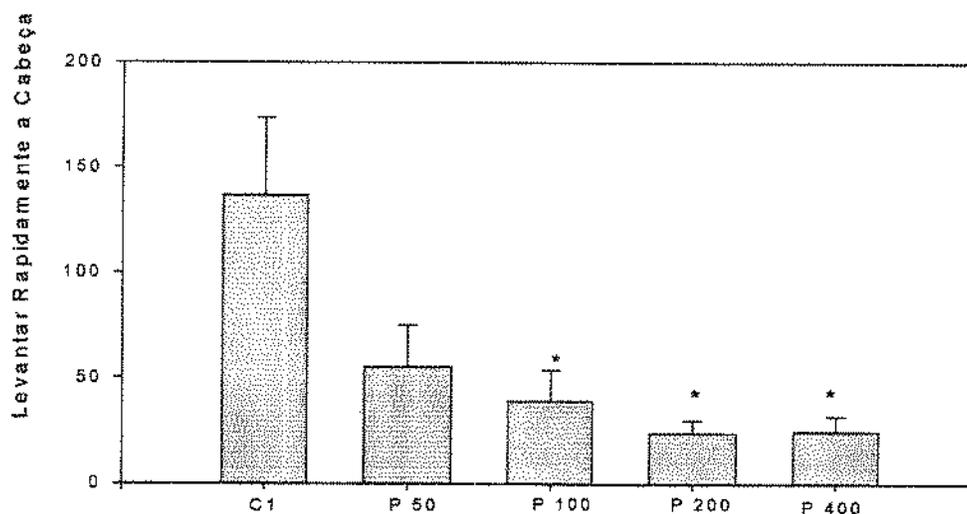


Figura 8. Efeito da co-administração de diferentes concentrações do antagonista seletivo do receptor histaminérgico do tipo H_1 , pirilamina, sobre a resposta comportamental induzida pela administração de formalina 2,5 %. Cada coluna (média±EP) representa a média do comportamento caracterizado pelo ato de levantar rapidamente a cabeça. * $p < 0,05$, teste Tukey, indica uma diminuição significativa em relação a C1 (formalina 2,5 %).

7. Efeito da co-administração de diferentes concentrações de pirilamina e formalina 2,5 % sobre a soma dos comportamentos caracterizados pelo ato de coçar a região orofacial e levantar rapidamente a cabeça:

A co-administração de diferentes concentrações (50; 100; 200 ou 400 μg , 25 μl) do antagonista seletivo do receptor histaminérgico do tipo H_1 , pirilamina, e formalina 5 % (25 μl) na região da ATM de ratos promoveu uma diminuição significativa ($p < 0,05$, Teste Tukey) na resposta comportamental caracterizada pela soma dos atos de coçar a região orofacial e levantar rapidamente a cabeça em relação à administração de formalina 2,5 % (50 μl) a partir da concentração de 100 μg . (Tabela 8, Figura 7).

A administração de pirilamina em sua maior concentração (400 μg , 50 μl) na ATM contralateral a que recebeu a administração de formalina (2,5 % ,50 μl) foi ineficaz em reduzir ($p > 0,05$, teste T) a resposta comportamental induzida pela administração de formalina (Tabela 8, Figura 8).

Tabela 10. Efeito da co-administração de diferentes concentrações do antagonista seletivo do receptor histaminérgico do tipo H₁, pirilamina, sobre a resposta comportamental induzida pela administração de formalina 2,5 %. Os dados expressos como média±EP correspondem à média da soma dos comportamentos caracterizados pelos atos de coçar a região orofacial e levantar rapidamente a cabeça. Valores entre parênteses () indicam o número de ratos em cada grupo. Controle 1 (C1) representa o grupo de animais submetidos à administração de formalina 2,5 % na região da ATM; Controle 2 (C2) representa o grupo de animais submetidos à administração de pirilamina 400 µg na região da ATM contralateral à submetida a administração formalina 2,5 %.

GRUPOS	MÉDIA±EPM
C1 (n=08)	347,17±61,33
C2 (n=08)	201,62±19,96
Pirilamina 50 µg (n=08)	176,13±49,34
Pirilamina 100 µg (n=08)	123,86±28,83*
Pirilamina 200 µg (n=08)	108,51±16,15*
Pirilamina 400 µg (n=08)	80,39±15,89*

* p<0,05, teste Tukey, indica diferença significativa em relação a C1.

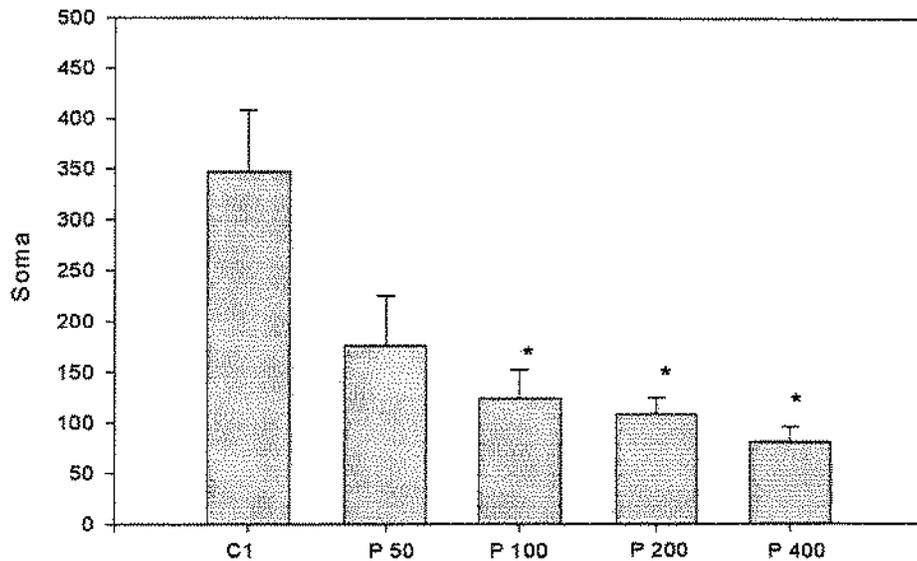
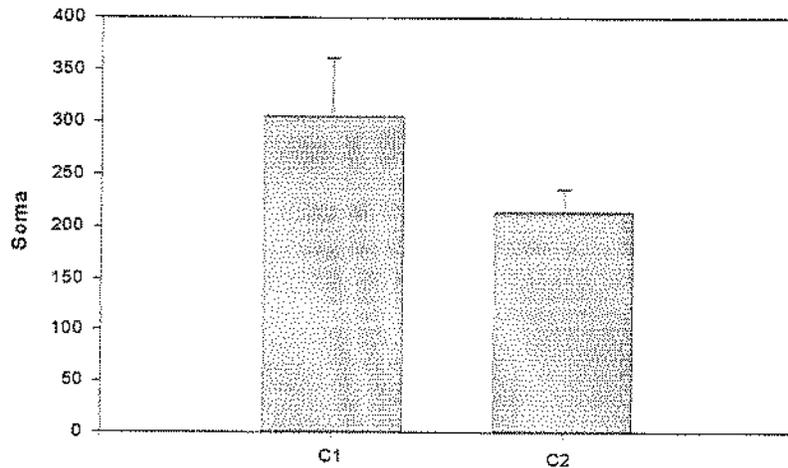


Figura 9. Efeito da co-administração de diferentes concentrações do antagonista seletivo do receptor histaminérgico do tipo H_1 , pirilamina, sobre a resposta comportamental induzida pela administração de formalina 2,5 %. Cada coluna (média±EPM) representa a média da soma dos comportamentos caracterizados pelos atos de coçar a região orofacial e levantar rapidamente a cabeça. * $p < 0,05$, teste Tukey, indica uma diminuição significativa em relação a C1 (formalina 2,5 %).



C1 (controle 1): formalina 2,5 % na ATM
 C2 (controle 2): formalina 2,5 % na ATM ipsilateral e
 pirilamina 400 µg na ATM contralateral

Figura 10. Efeito desencadeado pela administração do antagonista seletivo do receptor histaminérgico do tipo H1, pirilamina, na região da ATM contralateral à submetida a administração de formalina 2,5 %. Cada coluna (média±EPM) representa a média da soma dos comportamentos caracterizados pelos atos de coçar a região orofacial e levantar rapidamente a cabeça. Não houve diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$, teste T).

8. *Efeito da co-administração de QX-314 a 2 % e formalina a 2,5 % na região da ATM de ratos e da administração intraperitoneal de morfina 30 minutos antes da administração periarticular de formalina 2,5 % sobre os comportamentos caracterizados pelo ato de coçar a região orofacial e levantar rapidamente a cabeça avaliados separadamente:*

A co-administração do derivado quaternário da lidocaína hidrofílica, QX-314 a 2 % (25µl) e formalina 5 % (25 µl) na região da ATM de ratos promoveu uma diminuição significativa ($p < 0,05$, teste T e Mann Whitney, respectivamente) na resposta comportamental caracterizada pelo ato de coçar a região orofacial (Tabela 11, Figura 11) e bloqueou a resposta comportamental caracterizada pelo ato de levantar rapidamente a cabeça induzida pela administração de formalina 2,5 % (Tabela 12, Figura 12).

A administração intraperitoneal de morfina 4mg/kg (10ml/kg) e de formalina 2,5 % (50 µl) na região da ATM de ratos promoveu uma diminuição significativa ($p < 0,05$, Mann Whitney) na resposta comportamental caracterizada pelo ato de coçar a região orofacial (Tabela 11, Figura 11) e na resposta comportamental caracterizada pelo ato de levantar rapidamente a cabeça (Tabela 12, Figura 12).

Tabela 11. Efeito da co-administração do derivado quaternário da lidocaína hidrofílica, QX-314 a 2 % e formalina 2,5 % e da administração de morfina e formalina 2,5 % na região da ATM de ratos sobre a resposta comportamental caracterizada pelo ato de coçar a região orofacial. Os dados expressos como média±EP correspondem à média do comportamento caracterizado pelo ato de coçar a região orofacial. Valores entre parênteses () indicam o número de ratos em cada grupo.

GRUPOS	MÉDIA±EP
Formalina 2,5 % (n=08)	210,29±60,6
QX 314 2 % (n=06)	43,25±8,47 *
Morfina (n=06)	31,22±11,67*

* $p < 0,05$, teste T e Mann Whitney, respectivamente, indica diferença significativa em relação a formalina 2,5 %.

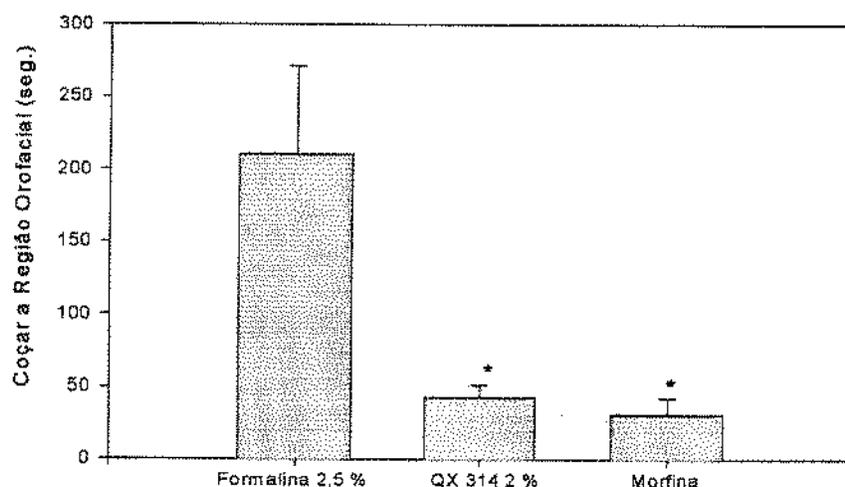


Figura 11. Efeito da co-administração do derivado quaternário da lidocaína hidrofílica, QX-314 a 2 % e formalina 2,5 % e da administração de morfina 30 minutos antes da administração de formalina 2,5 % na região da ATM de ratos sobre a resposta comportamental caracterizada pelo ato de coçar a região orofacial. Cada coluna (média) representa a média do comportamento caracterizado pelo ato de coçar a região orofacial. * $p < 0,05$, teste T e Mann Whitney, indica uma diminuição significativa em relação a formalina 2,5 %.

Tabela 12. Efeito da co-administração do derivado quaternário da lidocaína hidrofílica, QX-314 a 2 % e formalina 2,5 % e da administração de morfina 30 minutos antes da administração de formalina 2,5 % na região da ATM de ratos sobre a resposta comportamental caracterizada pelo ato de levantar rapidamente a cabeça. Os dados expressos como mediana correspondem à mediana do comportamento caracterizado pelo ato de levantar rapidamente a cabeça. Valores entre parênteses () indicam o número de ratos em cada grupo.

GRUPOS	MEDIANA
Formalina 2,5 % (n=08)	105,5
QX 314 2 % (n=06)	0 *
Morfina (n=06)	24 *

* $p < 0,05$, Mann Whitney, indica diferença significativa em relação a formalina 2,5 %.

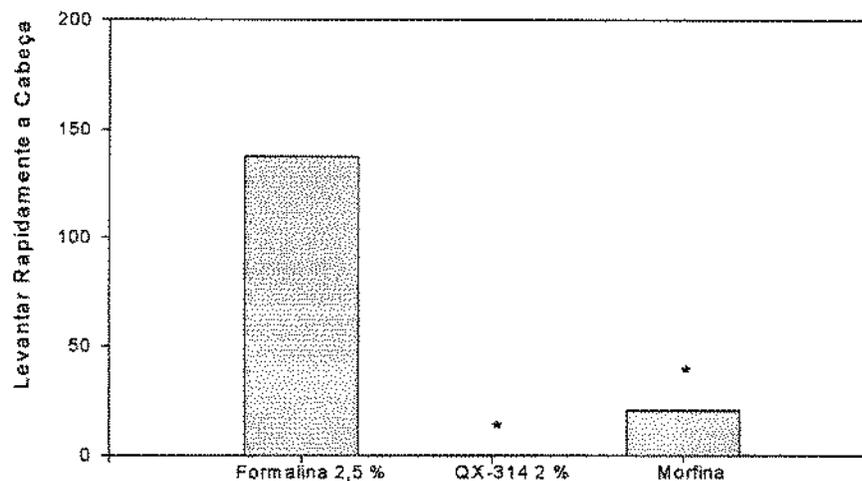


Figura 12. Efeito da co-administração do derivado quaternário da lidocína hidrofílica, QX-314 a 2 % e formalina 2,5 % e da administração de morfina 30 minutos antes da administração de formalina 2,5 % na região da ATM de ratos sobre a resposta comportamental caracterizada pelo ato de levantar rapidamente a cabeça. Cada coluna (mediana) representa a mediana do comportamento caracterizado pelo ato de levantar rapidamente a cabeça. * $p < 0,05$, Mann Whitney, indica uma diminuição significativa em relação a formalina 2,5 %.

9. *Efeito da administração de QX-314 a 2 % na região da ATM de ratos e da administração intraperitoneal de morfina sobre a soma dos os comportamentos caracterizados pelo ato de coçar a região orofacial e levantar rapidamente a cabeça induzidos pela administração periarticular de formalina:*

A co-administração do derivado quaternário da lidocaina hidrofílica, QX-314 a 2 % (25µl) e formalina 5 % (25 µl) na região da ATM de ratos promoveu uma diminuição significativa ($p < 0,05$, teste T) na resposta comportamental caracterizada pela soma dos comportamentos caracterizados pelo ato de coçar a região orofacial e levantar rapidamente a cabeça (Tabela 13, Figura 13).

A administração intraperitoneal de morfina 4mg/kg (10ml/kg) 30 minutos antes da administração de formalina 2,5 % (50 µl) na região da ATM de ratos promoveu uma diminuição significativa ($p < 0,05$, teste T) na resposta comportamental caracterizada pela soma dos comportamentos caracterizados pelo ato de coçar a região orofacial e levantar rapidamente a cabeça (Tabela 13, Figura 13).

Tabela 13. Efeito da co-administração do derivado quaternário da lidocaína hidrofílica, QX-314 a 2 % e formalina 2,5 % e da administração de morfina 30 minutos antes da administração de formalina 2,5 % na região da ATM de ratos sobre a resposta comportamental caracterizada pela soma do comportamento de coçar a região orofacial e levantar rapidamente a cabeça. Os dados expressos como média±EP correspondem à média da soma dos comportamentos caracterizados pelos ato de coçar a região orofacial e levantar rapidamente a cabeça. Valores entre parênteses () indicam o número de ratos em cada grupo.

GRUPOS	MÉDIA±EP
Formalina 2,5 % (n=08)	347,17±61,33
QX 314 2 % (n=06)	43,25±8,47 *
Morfina (n=06)	51,71±7,32 *

*p<0,05, teste T, indica diferença significativa em relação a formalina 2,5 %.

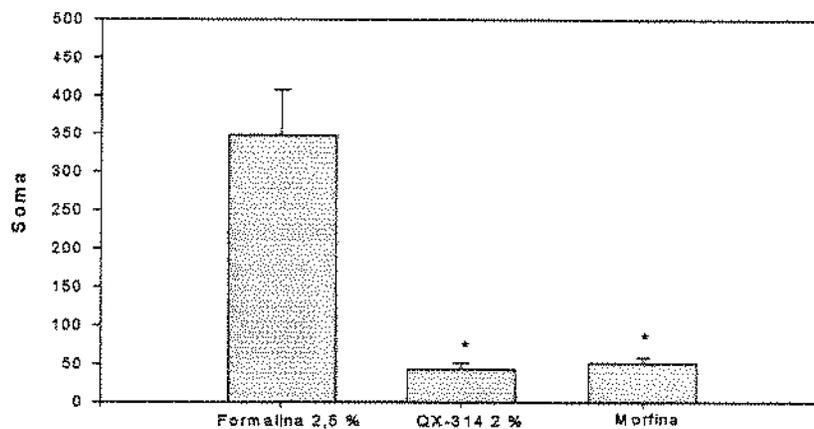


Figura 13. Efeito da co-administração do derivado quaternário da lidocaína hidrofílica, QX-314 a 2 % e formalina 2,5 % e da administração de morfina 30 minutos antes da administração de formalina 2,5 % na região da ATM de ratos sobre a resposta comportamental caracterizada pela soma do comportamento de coçar a região orofacial e levantar rapidamente a cabeça. Cada coluna (média±EP) representa a média da soma dos comportamentos caracterizados pelos ato de coçar a região orofacial e levantar rapidamente a cabeça. * p<0,05, teste T, indica uma diminuição significativa em relação a formalina 2,5 %.

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS:

A dor, tanto em seres humanos como em animais experimentais, é acompanhada por respostas reflexas, autonômicas e comportamentais. A quantificação dessas respostas permite uma avaliação indireta da dor. A resposta reflexa caracterizada pela contração simultânea de músculos elevadores e depressores da mandíbula é freqüentemente observada nas condições dolorosas associadas ao trismo (YU *et al.*, 1994; TAMBELI *et al.*, 1997). As respostas autonômicas podem incluir aumento de pressão arterial e aumento de freqüência cardíaca (TAYLOR *et al.*, 1995) e as respostas comportamentais podem ser expressas em humanos por choro e irritabilidade. Os mecanismos dolorosos também podem ser estudados através da quantificação de respostas comportamentais induzidas experimentalmente pela aplicação de estímulos nocivos em animais laboratoriais.

Na verdade, um grande número de testes comportamentais tem sido desenvolvido para estudar a resposta dolorosa em animais. O teste da formalina permite uma quantificação de uma resposta dolorosa espontânea desencadeada por um estímulo nocivo de longa duração, que se assemelha à algumas características da dor pós-traumática (DUBUISSON & DENNIS, 1977; HUNSKAAR & HOLE, 1987; ROSLAND *et al.*, 1990; DALLEL *et al.*, 1995).

Os resultados do presente trabalho demonstraram que a administração de diferentes concentrações de formalina na região da ATM de ratos produz uma resposta comportamental quantificável e sugere que esta resposta seja dose-dependente, possibilitando o estudo das condições dolorosas provenientes da ATM. Tal resposta é caracterizada por três tipos de comportamentos: a exacerbação do comportamento de coçar a região orofacial, o ato de levantar rapidamente a cabeça e o ato de tombar a cabeça para o lado injetado (Figura 3, 4; Tabela 5).

Um outro comportamento que pode ser observado, mas que não pôde ser considerado um comportamento induzido pela administração de formalina, é o comportamento de abertura e fechamento bucal. A administração de diferentes concentrações de formalina na região da ATM de ratos não promoveu um aumento significativo neste comportamento em relação à administração de um mesmo volume (50 μ l) de salina (Figura 1). Por outro lado, pôde-se observar um aumento significativo no comportamento de abertura e fechamento bucal em animais submetidos a administração de salina na região da ATM (50 μ l) em relação aos animais que não recebem nenhum tipo de tratamento (Figura 2). Diante disto, é possível que o comportamento de abertura e fechamento bucal tenha sido causado por uma estimulação dos mecanorreceptores da ATM provocada pelo volume (50 μ l) injetado na mesma, e não pela ação da formalina.

Dentre a multiplicidade das funções do comportamento de coçar, seu papel como resposta dolorosa é de importância particular à pesquisa experimental da dor. Os padrões de coçar provocados por irritação localizada ou por estimulação nociva têm uma organização diferente daquela relacionada à manutenção da pelagem, termorregulação ou sinalização social. O comportamento de coçar dos roedores, que não está relacionado à resposta dolorosa, consiste de episódios prolongados de cuidado e atenção com a pelagem altamente organizados. Nesse caso, o ato de coçar é realizado no sentido rostrocaudal, iniciando-se na região facial com seqüências de coçar a face estereotipadas e simétricas ao transitar de uma região do corpo para outra (VOS *et al.*, 1998). A administração de diferentes concentrações de formalina na região da ATM de ratos promoveu um aumento significativo no comportamento de coçar a região orofacial em relação a administração de salina (Figura 3). Os animais que tiveram o comportamento de coçar exacerbado em decorrência da administração de formalina na região da ATM coçaram a região orofacial de forma assimétrica com a pata dianteira ipsilateral e, eventualmente, com a pata traseira, apesar do movimento de coçar a região orofacial com a pata dianteira ter sido freqüentemente acompanhado da pata contralateral. Embora o comportamento de coçar a região orofacial assemelhe-se ao comportamento relacionado com o cuidado com a pelagem, tem sido demonstrado que uma distribuição assimétrica e prolongada no ato de coçar a face não ocorre espontaneamente em ratos normais (VOS *et al.*, 1998) e que o ato de coçar a região

orofacial com a pata dianteira ipsilateral freqüentemente é acompanhado por movimentos similares da pata contralateral, após a administração de formalina na região perioral (CLAVELOU *et al.*, 1989).

Assim como o comportamento de coçar a região injetada assemelha-se ao comportamento relacionado ao cuidado com a pelagem, o comportamento de abertura e fechamento bucal assemelha-se ao de roer, que também é um comportamento apresentado espontaneamente por ratos não-tratados. Dentre as respostas comportamentais não apresentadas espontaneamente por animais não-tratados e nem mesmo pelos submetidos à administração de salina na região da ATM incluem-se as caracterizadas pelo ato de levantar rapidamente a cabeça e pelo ato de tombar a cabeça para o lado injetado, observadas após a administração de formalina na região da ATM (Figura 4, Tabela 5). O comportamento de dor caracterizado pela elevação rápida e intermitente da pata submetida à injeção subcutânea de formalina assemelha-se muito ao comportamento caracterizado pelo ato de levantar rapidamente a cabeça induzido pela administração de formalina na ATM.

O comportamento de tombar a cabeça para o lado da administração de formalina na ATM é muito similar àquele observado clinicamente em pacientes com dor referida associada a tecido profundo, como, por exemplo, a dor dental. No caso de dor dental é comum o paciente apresentar-se com a cabeça inclinada para o lado do dente afetado. Embora tenha sido observado em todos os animais submetidos a

administração de formalina na região da ATM, a avaliação do comportamento de tombar a cabeça é extremamente difícil, uma vez que, o momento exato a partir do qual o animal emite esse comportamento é muito variável e subjetivo, considerando que o animal tomba a cabeça progressivamente ao longo do experimento. Diante disso, o comportamento de tombar a cabeça foi avaliado pela incidência em que ocorria e pôde-se observar que todos os animais submetidos a administração de formalina na região da ATM emitiram este comportamento (Tabela 5).

Uma das características da resposta comportamental induzida pela administração da formalina é seu padrão bifásico, no entanto, em decorrência da metodologia empregada no presente estudo não foi possível observar as respostas comportamentais emitidas durante a primeira fase, pois durante esse período os animais apresentaram um leve efeito residual da inalação de Halotano (Figura 5). A administração de formalina na região da ATM de ratos sem nenhum tipo de indução anestésica seria praticamente inviável por se tratar de um tecido profundo, de difícil acesso. Além disso, submeteria os animais a um estímulo estressante de grande intensidade que, além de desnecessário, constituiria por si só, uma outra variável, pois o estresse pode alterar a sensibilidade à dor (CLAVELOU *et al.*, 1989). Além do mais, parece bem documentado na literatura o mecanismo que envolve a primeira fase do teste da formalina (DUBUISSON & DENNIS, 1977; HUNSKAAR & HOLE, 1987; CLAVELOU *et al.*, 1989; ROSLAND *et al.*, 1990), ao passo que, resultados contraditórios na literatura têm gerado grande controvérsia a respeito dos

mecanismos que envolvem a segunda fase do teste da formalina (PARADA *et al.*, 1999).

O presente trabalho demonstra que a segunda fase de resposta comportamental induzida pela administração de formalina na região da ATM de ratos pode ser estudada a partir da concentração de 1,5 % (Figura 6). Este dado está de acordo com o obtido por CLAVELOU *et al.* (1995), para o teste da formalina no lábio. A evolução temporal da resposta comportamental induzida pela administração de formalina 2,5 % na região da ATM de ratos representa uma curva típica da segunda fase do teste da formalina (Figura 5), com pico por volta dos 27 minutos e posterior decréscimo até o final do período de observação de 45 minutos (CLAVELOU *et al.*, 1995).

Tem sido descrito na literatura (WHEELER-ACETO & COWAN, 1993; ABBOTT *et al.*, 1995; TAYLOR *et al.*, 1995) que a simples soma de mais de um comportamento parece ser a forma mais adequada de avaliar as respostas comportamentais induzidas pela administração de formalina, uma vez que, pode haver uma interação entre os comportamentos. Em 1977, quando o teste da formalina foi descrito pela primeira vez na pata por DUBBUISSON & DENNIS, os autores propuseram que a maneira mais correta de avaliar as respostas comportamentais induzidas pela formalina seria a utilização de um score, no qual pesos diferentes deveriam ser atribuídos aos diferentes comportamentos.

Os animais que foram submetidos ao teste da formalina na ATM emitiram os comportamentos de coçar a região orofacial e de levantar rapidamente a cabeça de forma alternada, ora coçando, ora levantando a cabeça, e estes comportamentos aparentemente se apresentavam de forma complementar, ou seja, os animais que ao longo do período de observação passavam maior tempo coçando a região orofacial apresentavam o comportamento de levantar rapidamente a cabeça em uma frequência proporcionalmente menor e vice-versa. Diante disto, essas respostas foram avaliadas conjuntamente somando-se (ABBOTT *et al.*, 1995) o período de tempo que os animais emitiram o comportamento de coçar com o número de vezes que os animais emitiram o comportamento de levantar a cabeça ao longo do período de observação. Para isto, estabeleceu-se que cada movimento caracterizado pelo ato de levantar rapidamente a cabeça, equivalia a um segundo.

Em adição, a análise correlacional dos dados (ABBOTT *et al.*, 1995) demonstrou uma correlação mais forte entre as concentrações de formalina administradas e as respostas nociceptivas avaliadas através da soma dos comportamentos de coçar a região orofacial e levantar rapidamente a cabeça em relação a quando as respostas são avaliadas separadamente (Tabela 6).

Tem sido demonstrado que a injeção de formalina é acompanhada por edema o qual atinge o pico (um aumento de 40% do volume) 4h após a administração da mesma e permanece por muitos dias (RABOISSON *et al.*, 1995). Embora a administração de formalina na região da ATM de ratos induza a formação

de edema quantificável espectrofotometricamente, este edema não está envolvido na resposta comportamental induzida pela mesma. Dados obtidos recentemente em nosso laboratório (TING *et al.*, 1999) demonstram que a administração de dextrano na concentração (200 µg) que induz a formação de um edema comparável ao induzido pela administração de formalina 2,5 %, não induz as respostas comportamentais caracterizadas pela exacerbação do comportamento de coçar a região orofacial, pelo ato de levantar rapidamente a cabeça e pelo ato de tombar a cabeça para o mesmo lado da injeção.

Nas últimas décadas houve uma explosão na pesquisa sobre a dor, conseqüentemente, novas informações sobre as bases neurofisiológicas da dor tornaram-se disponíveis. Os receptores da dor, podem ser sensibilizados por várias substâncias químicas incluindo a substância P, glutamato, serotonina, noradrenalina, encefalinas, endorfinas e histamina (RUMORE & SCHLICHTING, 1985). A injúria tecidual causada por trauma ou induzida experimentalmente pela administração de uma substância nociva, provoca a desgranulação de mastócitos da região e, conseqüentemente, a liberação de histamina. Já é conhecido na literatura o envolvimento da histamina nos fenômenos de hiperalgesia e sensibilização periférica. Acredita-se que a histamina atue periféricamente através de receptores específicos, basicamente do tipo H₁. Os anti-histamínicos, além de serem utilizados tradicionalmente em doenças alérgicas, como sedativos e como espamolíticos, têm

sido reconhecidos por seus efeitos analgésicos. Em adição, a histamina possui um papel crítico no desenvolvimento de edema (GUO *et al.*, 1997).

Os resultados deste trabalho demonstraram o envolvimento de mecanismos histaminérgicos endógenos nas respostas comportamentais induzidas pela administração de formalina na região da ATM de ratos através da ativação do receptor histaminérgico periférico do tipo H_1 , uma vez que essas respostas foram significativamente reduzidas quando o antagonista seletivo do receptor do tipo H_1 , a pirilamina, foi co-administrado com a formalina (Figura 9).

Embora os anti-histamínicos também apresentem efeito analgésico central (LAMBERTI *et al.*, 1996) a possibilidade da ocorrência de tal efeito foi descartada neste trabalho em decorrência da ineficácia do antagonista seletivo do receptor H_1 (400 μ g) em reduzir significativamente os comportamentos nociceptivos induzidos pela formalina, quando administrado na ATM contralateral (Figura 10).

A resposta comportamental induzida pela administração de formalina na região da ATM de ratos, avaliada através da soma dos comportamentos de coçar a região orofacial e levantar rapidamente a cabeça, aumentou significativamente a partir de 1,5 %. No entanto, a concentração intermediária de 2,5 % foi escolhida para ser co-administrada com as diferentes concentrações do antagonista do receptor histaminérgico do tipo H_1 , a pirilamina, para obter-se uma margem de segurança.

Muitos trabalhos têm-se preocupado com os mecanismos envolvidos na primeira e na segunda fase do teste da formalina. A primeira fase tem sido atribuída

a um efeito direto de substâncias algógenas sobre os nociceptores, enquanto que a segunda fase tem sido associada ao subsequente desenvolvimento de inflamação (HUNSKAAR & HOLE, 1987) e sensibilização central. Embora a segunda fase do teste da formalina tenha sido muito utilizada como um modelo de estudo do processo de sensibilização central (CODERRE *et al.*, 1990; CODERRE & MELZACK, 1990; CADET *et al.*, 1993; 1995) tem sido proposto que apenas a sensibilização central não é suficiente para manter a segunda fase de resposta (DALLEL *et al.*, 1995; TAYLOR *et al.*, 1995). Os resultados deste trabalho confirmam a importância dos mecanismos periféricos na segunda fase do teste da formalina, uma vez que a administração local do antagonista seletivo do receptor histaminérgico do tipo H₁ reduziu significativamente a resposta nociceptiva induzida pela administração de formalina na região da ATM de ratos (Figura 9).

Contudo, quando as respostas comportamentais induzidas pela co-administração de diferentes concentrações de pirilamina e formalina 2,5 % foram avaliadas separadamente pôde-se verificar que a co-administração do antagonista seletivo do receptor histaminérgico do tipo H₁, pirilamina, com a formalina reduziu significativamente a resposta comportamental caracterizada pelo ato de levantar rapidamente a cabeça (Tabela 9, Figura 8), mas não reduziu significativamente o comportamento de coçar a região orofacial (Tabela 8, Figura 7). Vale a pena ressaltar, como observado por WHEELER-ACETO & COWAN em 1993 para o teste da formalina na pata, que a diminuição em um único índice de comportamento

induzido pela administração de formalina pode ser um critério inadequado para demonstrar antinocicepção. O fato da co-administração da pirilamina e formalina reduzir significativamente o comportamento de levantar rapidamente a cabeça está de acordo com os dados obtidos por PARADA *et al.* em 1999 para o teste da formalina na pata, uma vez que os autores verificaram que a co-administração da pirilamina e formalina reduziu significativamente o comportamento de elevação rápida e intermitente da pata. Cabe lembrar que o comportamento de levantar rapidamente a cabeça induzido pela administração de formalina na região da ATM de ratos é muito semelhante ao comportamento de elevação rápida e intermitente da pata induzido pela administração de formalina na pata traseira de ratos, como descrito anteriormente.

Apesar de não ter sido diminuída significativamente pela pirilamina, a resposta comportamental caracterizada pela exacerbação do ato de coçar induzida pela aplicação de estímulo nocivo na face tem sido considerada uma resposta nociceptiva (CLAVELOU *et al.*, 1989 e 1995; VOS *et al.*, 1998). A administração de formalina causa injúria tecidual e a liberação no local de uma série de substâncias além da histamina que estimulam as fibras aferentes nociceptivas primárias, este fato poderia explicar a ineficiência da pirilamina em reduzir significativamente o comportamento de coçar a região orofacial.

Com o intuito de comprovar se as respostas comportamentais induzidas pela administração de formalina na região da ATM de ratos possuem caráter

nociceptivo, foram realizados mais dois grupos experimentais. Um grupo recebeu um bloqueio anestésico provocado pela co-administração do derivado quaternário da lidocaína hidrofílica, QX-314 a 2 % (25 µl), que se difunde muito rapidamente e formalina 5 % (25 µl) na região da ATM. Outro grupo recebeu a administração sistêmica (via intraperitoneal) de uma droga analgésica clássica, a morfina, em uma dose que não produziu nenhum efeito locomotor (4 mg/kg), 30 minutos antes da administração de formalina 2,5 % (50 µl).

Os resultados demonstraram que o bloqueio anestésico reduziu dramaticamente (a níveis comparáveis ao grupo que recebeu a administração de salina) a soma das respostas comportamentais caracterizadas pelo ato de coçar a região orofacial e levantar rapidamente a cabeça induzidas pela administração de formalina na região da ATM de ratos (Tabela 13, Figura 13), este dado está de acordo com o observado por TAYLOR *et al.*, 1995, no teste da formalina da pata. Quando as respostas comportamentais foram avaliadas separadamente pôde-se constatar também uma diminuição significativa na resposta caracterizada pelo ato de coçar a região orofacial (Tabela 11, Figura 11) e um bloqueio na resposta caracterizada pelo ato de levantar rapidamente a cabeça (Tabela 12, Figura 12).

A administração sistêmica de morfina reduziu significativamente (também a níveis comparáveis ao grupo que recebeu a administração de salina) a soma das respostas comportamentais caracterizadas pelo ato de coçar a região

orofacial e levantar rapidamente a cabeça induzidas pela administração de formalina na região da ATM de ratos (Tabela 13, Figura 13), como observado por CLAVELOU et al., 1989, no teste da formalina no lábio. Quando as respostas comportamentais foram avaliadas separadamente pôde-se constatar também uma diminuição significativa na resposta caracterizada pelo ato de coçar a região orofacial (Tabela 11, Figura 11) e na resposta caracterizada pelo ato de levantar rapidamente a cabeça (Tabela 12, Figura 12). Assim sendo, as repostas comportamentais nociceptivas caracterizadas pela exacerbação do ato de coçar a região orofacial e as caracterizadas pelo ato de levantar rapidamente a cabeça podem ser utilizadas como índice de dor orofacial para o teste da formalina na ATM de ratos, seja quando avaliadas separadamente ou em conjunto pela soma das mesmas.

CONCLUSÕES:

- Este estudo demonstrou que o teste da formalina na ATM de ratos produz respostas comportamentais nociceptivas quantificáveis caracterizadas pela exacerbação do ato de coçar a região orofacial e caracterizadas pelo ato de levantar rapidamente a cabeça, constituindo dessa forma um novo modelo experimental para estudar as condições dolorosas da ATM.
- Este estudo sugere que as respostas comportamentais nociceptivas induzidas pela administração de diferentes concentrações de formalina na região da ATM de ratos são dose-dependentes.
- O teste da formalina na ATM de ratos permite a avaliação apenas da segunda fase de respostas.
- Os resultados evidenciam o envolvimento da histamina endógena na resposta comportamental induzida pela administração de formalina na ATM de ratos e demonstram a participação dos receptores histaminérgicos periféricos do tipo H₁ nessa resposta, confirmando a importância dos mecanismos periféricos na gênese da segunda fase do teste da formalina.

- As respostas comportamentais induzidas pela administração de formalina na região da ATM de ratos são significativamente reduzidas pela lidocaína e morfina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. ABBOTT, F.V., FRANKLIN, K.B.J., WESTBROOK, R.F. The formalin test: scoring properties of the first and second phases of the pain response in rats. **Pain**, Amsterdam, v.60, n.1, p.91-102, Jan. 1995.
2. AGHABEIGI, B. The pathophysiology of pain. **Br Dent J**, London, v.173, n.3, p.91-96, Aug. 1992.
3. BEREITER, D.A., BENETTI, A.P. Excitatory amino release within spinal trigeminal nucleus after mustard oil injection into the temporomandibular joint region of the rat. **Pain**, Amsterdam, v.67, n.2-3, p.451-459, Oct. 1996.
4. CADET, R., AIGOUY, L., WODA, A. Enhanced nociceptive behaviour following conditioning injection of formalin in the perioral area of the rat. **Brain Res**, Amsterdam, v.676, n.1, p.189-195, Apr. 1995.
5. CADET, R., AIGOUY, L., WODA, A. Sustained hiperalgesia can be induced in the rat by a single formalin injection and depends on the initial nociceptive inputs. **Neurosci Lett**, Limerick, v.156, n.1-2, p.43-46, June 1993.

* De acordo com a NBR 6023, de 1989, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

6. CADET, R. et al. Is there a correlation between scores of nociceptive behavioral responses to formalin injections given at different body sites in the rat? **Neurosci Lett**, Limerick, v.242, n.3, p.123-126, Feb. 1998.
7. CLAVELOU, P. et al. Application of the formalin test to the study of orofacial pain in the rat. **Neurosci Lett**, Limerick, v.103, n.3, p.349-353, Sept. 1989.
8. CLAVELOU, P. et al. The orofacial formalin test in rats: effects of different formalin concentrations. **Pain**, Amsterdam, v.62, n.3, p.295-301, Sept. 1995.
9. CODERRE, T.J. et al. Contribution of central neuroplasticity to pathological pain: review of clinical and experimental evidence. **Pain**, v.52, n.3, p.259-285, Mar. 1993.
10. CODERRE, T.J., MELZACK, R. The contribution of excitatory amino acids to central sensitization and persistent nociception after formalin-induced tissue injury. **J Neurosci**, New York, v.12, n.9, p.3665-3670, Sept. 1992.
11. CODERRE, T.J., VACCARINO, A.L., MELZACK, R. Central nervous system plasticity in the tonic pain response to subcutaneous formalin injection. **Brain Res**, Amsterdam, v.535, n.1, p.155-158, Dec. 1990.

12. COOPER, S.A. Treating acute pain: do's and don'ts, pros and cons. **J. Endod**, Baltimore, v.16, n.2, p.85-91, Feb. 1990.
13. DALLEL, R. et al. Evidence for a periferal origin of the tonic nociceptive response to subcutaneous formalin. **Pain**, Amsterdam, v.61, n.1, p.11-16, Apr. 1995.
14. DUBNER, R. Pain control in dentistry: the anatomic and phisiologic basis of orofacial pain. **Pain**, Amsterdam, v.8, n.6, p.408-416, June 1986.
15. DUBNER, R., RUDA, M.A. Activity-dependent neuronal plasticity following tissue injury and inflammation. **Trends Neurosci**, Barking, v.15, n.3, p.96-103, Mar. 1992.
16. DUBUISSON, D., DENNIS, S.G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain**, Amsterdam, v.4, n.2, p.161-174, Dec. 1977.
17. ESIENBERG, E., VOS, B.P., STRASSMAN, A.M. The NMDA antagonista memantine blocks pain behavior in a rat model of formalin-induced facial pain. **Pain**, Amsterdam, v.54, n.3, p.301-307, Sept. 1993.
18. GUO, Y. et al. Role of mast cell histamine in the formation of rat paw edema: a microdialysis study. **Eur J Pharmacol**, Amsterdam, v.331, n.2-3, p.237-243, July 1997.

19. HASS, D.A. Development of an orofacial model of acute inflammation in rat. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.37, n.5, p.417-422, 1992.
20. HATHAWAY, C.B., HU, J.W., BEREITER, D.A. Distribution of Fos-like immunoreactivity in the caudal brainstem of the rat following noxious chemical stimulation of the temporomandibular joint. **J Comp Neur**, New York, v.356, n.3, p.444-456, June 1995.
21. HU, J.M. et al. Deep craniofacial pain : involvement of trigeminal subnucleus caudalis and its modulation. In: WORLD CONGRESS ON PAIN, PROGRESS IN PAIN RESEARCH AND MANAGEMENT, 8. 1997. **Proceedings ...** v.8, 1997.
22. HU, J.M. et al. Electromyographic and trigeminal brainstem neuronal changes associated with inflammatory irritation of superficial and deep craniofacial tissues in rats. In: WORLD CONGRESS ON PAIN, PROGRESS IN PAIN RESEARCH AND MANAGEMENT, 7. 1997. **Proceedings ...** v.2, 1994.
23. HUNSKAAR, S., HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, Amsterdam, v.30, n.1, p.104-114, July 1987.
24. LAMBERTI, C. et al. Investigation into the role of histamine receptors in rodent antinociception. **Pharmacol Bioch Behav**, New York, v.53, n.3, p.567-574, Mar. 1996.

25. MALMBERG-AIELLO, P. et al. Evidence for hiprenociception induction following histamine H1 receptor activation in rodents. **Life Sci**, Oxford, v.63, n.6, p.463-476, 1998.
26. MERSKY, H. Classification of the cronic pain: syndromes and definition of pain terms. **Pain**, Amsterdan, v.3, p.S1, 1986. [Suppl.]
27. MJELLEM-JOLY, N. et al. Intratecal co-administration of substance P and NMDA augments nociceptive responses in the formalin test. **Pain**, Amsterdam, v.51, n.1, p.195-198, Nov. 1992.
28. PARADA, C.A., LUCCARINI, P., WODA, A. Effect of na NMDA receptor antagonist on the wind-up neurons in the trigeminaloralis subnucleus. **Brain Res**, Amsterdam, v.761, n.1, p.313-320, July 1997.
29. PARADA, C.A., TAMBELI, C.H., FERREIRA, S.H. Peripheral histamine H₁ receptors but not bradykinin B₁ and B₂ receptors are involved in the second phase of the formalin test in rats. In: WORLD CONGRESS ON PAIN, PROGRESS IN PAIN RESEARCH AND MANAGMENT, 9. 1999. Viena. Anais... Viena, 1999. p. 34.
30. RABOISSON, P. et al. Effects of subcutaneous formalin on the activity of trigeminal brain stem nociceptive neurons in the rat. **J Neurophysiol**, Bethesda, v.73, n.2, p.496-505, Feb. 1995.

31. ROSLAND, J.H. The formalin test in mice: the influence of ambient temperature. **Pain**, Amsterdam, v.45, n.2, p.2111-216, May 1991.
32. ROSLAND, J.H. et al. The formalin test in mice: effect of formalin concentration. **Pain**, Amsterdam, v.42, n.2, p.235-242, Aug. 1990.
33. RUMORE, M.M., SCHLICHTING, D.A. Analgesic effects of antihistaminics. **Life Sci**, Oxford, v.36, n.5, p.403-416, Feb. 1985.
34. SESSLE, B.J. Brainstem mechanisms underlying craniofacial pain and its modulation. **Adv Pain Res Ther**, v.22, p.413-421, 1995.
35. TAMBELI, C.H., TSAI, C.M., HU, J.W. Central opioid modulation of mustard oil-evoked jaw muscle activity. **J Dent Res**, Washington, v.76, p.171, 1997.
36. TAYLOR, B.K., PETERSON, M.A., BASBAUM, A.I. Persistent cardiovascular and behavioral nociceptive responses to subcutaneous formalin require peripheral nerve input. **J Neurosci**, New York, v.15, n.11, p.7575-7584, Nov. 1995.
37. TING, E. et al. Avaliação do edema na resposta dolorosa induzida pela administração de formalina na ATM de ratos. In: JORNADA ODONTOLÓGICA DE PIRACICABA, 6. 1999. Piracicaba. Anais... Piracicaba: Fop-Unicamp, 1999. p 105

38. VOS, P.B., HANS, G., ADRIAENSEN, H. Behavioral assessment of facial pain in rats: face grooming patterns after painful and non-painful sensory disturbances in the territory of the rat's infraorbital nerve. **Pain**, Amsterdam, v.76, n.1-2, p.173-178, May 1998.
39. WHEELER-ACETO, H., COWAN, A. Naloxone causes apparent antinociception and pronociception simultaneously in the rat paw formalin test. **Eur J Pharmacol**, Amsterdam, v.236, n.2, p.193-199, May 1993.
40. YANAI, K. et al. Behavioural characterization and amounts of brain monoamines and their metabolites in the mice lacking histamine H1 receptors. **Neuroscience**, New York, v.87, n.2, p.479-487, Nov. 1998.
41. YU, X.M., SESSLE, B.J., HU, J.W. Differential effects of cutaneous and deep application of inflammatory irritant on mechanoreceptive field properties of trigeminal brain stem nociceptive neurons. **J Neurophysiol**, Bethesda, v.70, n.4, p.1704-1707, Oct. 1993.
42. YU, X.M. et al. Administration of opiate antagonist naloxone induces recurrence of increased jaw muscle activities related to inflammatory irritant application to rat temporomandibular joint region. **J Neurophysiol**, Bethesda, v.72, n.3, p.1430-1433, Sept. 1994.
43. YU, X.M. et al. Effects of inflammatory irritant application to the rat temporomandibular joint on jaw and neck muscle activity. **Pain**, Amsterdam, v.60, n.2, p.143-149, Feb. 1994.

ANEXO:

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

DATA: / /
GRUPO:
PESO: g

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

AF: comportamento de abertura e fechamento bucal (segundos)

CO: comportamento de coçar a região orofacial (segundos)

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

OBSERVAÇÕES:

APÊNDICE:

Tabelas suplementares dos resultados individuais da amostra.

Tabela 1. Valores individuais do efeito da administração de diferentes concentrações de formalina na região da ATM de ratos sobre o comportamento de abertura e fechamento bucal.

Animais	Formalina				
	0,0%	0,5%	1,5%	2,5%	5,0%
1	0	4,42	9,7	133,09	10,74
2	16,22	21,64	-	39,48	20,75
3	47,11	69,84	1,43	0	55,28
4	11,71	24,96	30,7	13,99	1,49
5	29,54	-	22,22	60,57	29,34
6	0	7,24	-	-	36,54
7	62,97	-	48,89	26,91	1,5
8	32,98	42,62	18,76	-	68,45
9	30,32	1,4	8,55	16,87	11,26
10	52,51	-	17,91	28,12	-
média ± EP	28,33±6,82	24,59±9,29	19,77±5,25	39,88±14,77	26,15±7,87

Tabela 2. Valores individuais do efeito de diferentes tratamentos sobre o comportamento de abertura e fechamento bucal.

Animais	não-tratado	sham	salina
1	4,97	15,75	0
2	12,54	24,99	16,22
3	0	10,76	47,11
4	0	0	11,71
5	4,26	11,61	29,54
6	-	-	0
7	-	-	62,97
8	-	-	32,98
9	-	-	30,32
10	-	-	52,51
média±EP	4,35±2,29	12,62±4,04	28,33±6,82

Tabela 3. Valores individuais do efeito da administração de diferentes concentrações de formalina na região da ATM de ratos sobre o comportamento de coçar a região orofacial.

Animais	Formalina				
	0,0%	0,5%	1,5%	2,5%	5,0%
1	59,09	89,5	197,94	39,99	74,61
2	88,36	148,02	-	168,18	201,55
3	55,4	98,07	95	81,22	38,78
4	76,09	155,61	138,28	511,64	132,08
5	55,89	-	149,07	138,43	191,8
6	56,13	151,11	-	-	302,46
7	44,29	-	189,07	179,41	434,69
8	32,49	68,67	48,34	-	21,97
9	30,78	144,67	96,7	441,55	321,6
10	35,45	-	268,93	121,92	-
mediana	55,64	144,67	143,67	153,30	191,80

Tabela 4. Valores individuais do efeito da administração de diferentes concentrações de formalina na região da ATM de ratos sobre o comportamento de levantar rapidamente a cabeça.

Animais	Formalina				
	0,0%	0,5%	1,5%	2,5%	5,0%
1	0	51	113	368	232
2	0	54	-	128	83
3	0	31	78	89	234
4	0	77	40	56	137
5	0	-	111	63	32
6	0	64	-	-	78
7	0	-	235	74	120
8	0	82	75	-	212
9	0	29	205	195	110
10	0	-	71	122	-
mediana	0	54	94	105,5	120

Tabela 5. Valores individuais da resposta comportamental (avaliada pela soma) induzida pela administração de diferentes concentrações de formalina na região da ATM de ratos.

Animais	Formalina				
	0,0%	0,5%	1,5%	2,5%	5,0%
1	59,09	140,5	310,94	407,99	306,61
2	88,36	202,02	-	296,18	284,55
3	55,4	129,07	173	170,22	272,78
4	76,09	232,61	178,28	567,64	269,08
5	55,89	-	260,07	201,43	223,8
6	56,13	215,11	-	-	380,46
7	44,29	-	424,07	253,41	554,69
8	32,49	150,67	123,34	-	233,97
9	30,24	173,67	301,7	636,55	431,6
10	35,45	-	339,93	243,92	-
média±EP	53,34±5,93	177,66±15,04	263,92±35,47	347,17±61,33	328,62±36,02

Tabela 6. Valores individuais da resposta comportamental (avaliada pela soma) induzida pela co-administração de diferentes concentrações de pirilamina com formalina 2,5 % na região da ATM de ratos.

Animais	C 1	C2	Pirilamina			
			50µg	100µg	200µg	400µg
1	407,99	109,49	336,05	45,27	145,36	139,97
2	296,18	273,82	177,87	269,47	151,95	44,9
3	170,22	196,64	119,27	101,51	54,73	160,44
4	567,64	149,79	437,06	164,61	35,3	80,76
5	201,43	228,4	45,84	164,9	110,38	43,29
6	-	278,77	80,21	162,75	156,88	59,57
7	253,41	269,78	64,38	32,79	126,37	54,08
8	-	206,28	148,36	49,58	87,15	60,09
9	636,55	-	-	-	-	-
10	243,92	-	-	-	-	-
média±EP	347,17±61,3	201,6±19,9	176,1±49,3	123,8±28,8	108,5±16,1	80,4±15,9

C1 (controle 1): Formalina 2,5 % na ATM esquerda;

C2 (controle 2): Formalina 2,5 % na ATM esquerda e Pirilamina 400µg na ATM direita.

Tabela 7. Valores individuais da resposta comportamental caracterizada pelo ato de coçar a região orofacial induzida pela co-administração de diferentes concentrações de pirilamina com formalina 2,5 % na região da ATM de ratos.

Animais	C 1	Pirilamina			
		50µg	100µg	200µg	400µg
1	39,99	256,05	28,27	134,36	95,97
2	168,18	50,87	243,47	130,95	44,9
3	81,22	114,27	81,51	6,73	100,44
4	511,64	289,06	134,61	35,3	49,76
5	138,43	32,84	86,9	74,38	43,29
6	179,41	66,21	37,75	123,88	42,57
7	441,55	56,38	14,79	89,37	20,08
8	121,92	102,36	49,58	80,15	47,09
mediana	153,3	84,28	65,54	84,76	45,99

C1 (controle 1): Formalina 2,5 % na ATM esquerda;

Tabela 8. Valores individuais da resposta comportamental caracterizada pelo comportamento de levantar rapidamente a cabeça induzida pela co-administração de diferentes concentrações de pirilamina com formalina 2,5 % na região da ATM de ratos.

Animais	C 1	Pirilamina			
		50µg	100µg	200µg	400µg
1	368	80	17	11	44
2	128	127	26	21	0
3	89	5	20	48	60
4	56	148	30	0	31
5	63	13	78	36	0
6	74	14	125	33	17
7	195	8	18	37	34
8	122	46	0	7	13
média±EP	136,87±36,68	55,12±20,13	39,25±14,622	24,12±5,99	24,87±7,5

C1 (controle 1): Formalina 2,5 % na ATM esquerda;

Tabela 9. Valores individuais da resposta comportamental (avaliada pela soma) induzida pela co-administração de QX-314 2 % e formalina 2,5 % na região da ATM de ratos ou pela administração intraperitoneal de morfina 30 minutos antes da administração periarticular de formalina 2,5 %.

Animais	Formalina 2,5 %	QX-314 2 %	Morfina
1	407,99	77,57	35,46
2	296,18	30,54	43,92
3	170,22	22,46	59,03
4	567,64	51,16	36,19
5	201,43	27,09	52,51
6	253,41	50,71	83,18
7	636,55	-	-
8	243,92	-	-
média±EP	347,17±61,33	43,25±8,47	51,71±7,32

Tabela 10. Valores individuais da resposta comportamental caracterizada pelo ato de coçar a região orofacial induzida pela co-administração de QX-314 2 % e formalina 2,5 % na região da ATM de ratos ou pela administração de morfina 30 minutos antes da administração periarticular de formalina 2,5 %.

Animais	Formalina 2,5 %	QX-314 2 %	Morfina
1	39,99	77,57	35,46
2	168,18	30,54	7,92
3	81,22	22,46	20,03
4	511,64	51,16	5,19
5	138,43	27,09	35,51
6	179,41	50,71	83,18
7	441,55	-	-
8	121,92	-	-
média±EP	210,29±60,6	43,25±8,47	31,22±11,67

Tabela 11. Valores individuais da resposta comportamental caracterizada pelo comportamento de levantar rapidamente a cabeça induzida pela co-administração de QX-314 2 % e formalina 2,5 % na região da ATM de ratos ou pela administração de morfina 30 minutos antes da administração periarticular de formalina 2,5 %.

Animais	Formalina 2,5 %	QX-314 2 %	Morfina
1	368	0	0
2	128	0	36
3	89	0	39
4	56	0	31
5	63	0	17
6	74	0	0
7	195	-	-
8	122	-	-
mediana	105,5	0	24