



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA  
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



**CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**  
**Monografia de Final de Curso**

**Renata Furini**

**Estudo da participação de  
adrenoceptores beta 2 na nocicepção  
da Articulação Temporomandibular**

**UNICAMP**

PIRACICABA

-2010-



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA  
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



**Renata Furini**

# Estudo da participação de adrenocetores beta 2 na nocicepção da Articulação Temporomandibular

Monografia apresentada ao Curso  
de Odontologia da Faculdade de  
Odontologia de Piracicaba –  
UNICAMP para obtenção do Diploma  
de Cirurgiã-Dentista.

Orientadora: Nádía Cristina Fávoro Moreira

Co-orientadora: Profa. Dra. Cláudia Herrera Tambeli

PIRACICABA

-2010-

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA  
Bibliotecária: Elis Regina Alves dos Santos – CRB-8ª. / 8099

F977e Furini, Renata.  
Estudo da participação de adrenoceptores beta 2 na  
nocicepção da articulação temporomandibular / Renata  
Furini. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2010.  
44f. : il.

Orientador: Nádía Cristina Fávaro-Moreira, Cláudia  
Herrera Tambeli.

Monografia (Graduação) – Universidade Estadual de  
Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Fisiologia. 2. Nociceptores. 3. Disfunção  
temporomandibular. I. Fávaro-Moreira, Nádía Cristina. II.  
Tambeli, Cláudia Herrera III. Universidade Estadual de  
Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV.  
Título.

(eras/fop)



## **Dedicatória**

Dedico este trabalho à minha família, que sempre está presente guiando meus passos, e em especial ao meu avô Andreino Furini que partiu antes deste sonho ser concretizado, mas tenho a certeza que olha por mim todos os dias.

## **Agradecimentos**

Agradeço à Deus por me dar força para enfrentar todos os obstáculos.

À minha família por estar sempre presente, me apoiando.

Aos meus amigos por terem sido minha família durante esses anos e estarem sempre ao meu lado.

À família Wada Okoti, especialmente à Dona Rosa pela disposição e tempo dispensados, e à Letícia por me acompanhar e completar meu trabalho.

À Nádia Cristina Fávaro Moreira, pelo tempo e a paciência dedicados a este trabalho.

À professora Cláudia Herrera Tambeli pela oportunidade de expandir meus conhecimentos.

Aos queridos funcionários Carlos Alberto Feliciano e Eliete Riguetto por me ajudarem sempre com boa vontade e disposição;

À todas as pessoas que participaram e contribuíram para realização de nosso trabalho, direta ou indiretamente, meu agradecimento;

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, na pessoa do seu diretor, Jacks Jorge Junior, e especialmente ao Departamento de Ciências Fisiológicas, por me proporcionar um importante rumo ao crescimento científico e profissional.

"Mantenha seus pensamentos positivos, porque seus pensamentos tornam-se suas palavras.

Mantenha suas palavras positivas, porque suas palavras tornam-se suas atitudes.

Mantenha suas atitudes positivas, porque suas atitudes tornam-se seus hábitos.

Mantenha seus hábitos positivos, porque seus hábitos tornam-se seus valores.

Mantenha seus valores positivos, porque seus valores...

Tornam-se seu destino."

Mahatma Gandhi

## **Sumário**

<b>I. Resumo</b>	<b>viii</b>
<b>II. Introdução</b>	<b>01</b>
<b>III. Justificativa</b>	<b>05</b>
<b>IV. Materiais e Métodos</b>	<b>06</b>
<b>V. Resultados</b>	<b>13</b>
<b>VI. Discussão</b>	<b>15</b>
<b>VII. Figuras e Legendas</b>	<b>19</b>
<b>VIII. Conclusões</b>	<b>26</b>
<b>IX. Referências Bibliográficas</b>	<b>27</b>
<b>X. Anexo</b>	<b>30</b>

## Resumo

As disfunções temporomandibulares (DTM) são condições dolorosas que envolvem a articulação temporomandibular (ATM) e os músculos mastigatórios, apresentam maior prevalência, severidade e duração no sexo feminino e são comumente associadas à inflamação. Apesar das drogas antiinflamatórias não esteroidais (AINEs) serem frequentemente utilizadas no controle de dores inflamatórias, muitos pacientes podem apresentar intolerância ao tratamento prolongado e nem todos os pacientes com dor inflamatória na ATM respondem aos efeitos de tais medicamentos. Sabe-se que a dor inflamatória possui um componente simpático que pode predominar em casos com menor sensibilidade aos AINEs. Assim, os objetivos deste trabalho foram: 1- investigar a presença de RNAm de adrenoceptores  $\beta_2$  no gânglio trigeminal, 2 - verificar se a administração de agonistas de receptores  $\beta_2$  na região da articulação temporomandibular induz dor e 3 – verificar se a dor induzida pela ativação de adrenoceptores  $\beta_2$  na ATM seria mediada por um mecanismo indireto. Para quantificação do RNAm de receptores- $\beta_2$ , uma hora após a injeção de Carragenina ou salina nas duas ATMs os gânglios trigeminais foram dissecados, foi realizada a extração do RNAm e procedimentos de Real-Time PCR. Com o intuito de avaliar a participação desses receptores da nocicepção da ATM foram administrados na ATM de ratos machos agonistas de adrenoceptores  $\beta_2$ , com ou sem o antagonista seletivo desses receptores ou antiinflamatório glicocorticóide. Foi verificada a presença de RNAm de receptores- $\beta_2$  no gânglio trigeminal sugerindo a presença desses adrenoceptores na região da ATM. O comportamento nociceptivo resultante da administração de agonistas de adrenoceptores  $\beta_2$  Salbutamol ou Metaproterenol foi similar à resposta nociceptiva induzida pelo teste da formalina. Co-administração do antagonista de adrenoceptores  $\beta_2$  ICI 118.551 ou do antiinflamatório esteroideal Dexametasona reduziu significativamente a nocicepção

induzida por Salbutamol ou Metaproterenol na ATM. Estes resultados sugerem que adrenoceptores  $\beta_2$  na região da ATM modulam a nocicepção através de um mecanismo direto das catecolaminas atuando em receptores  $\beta_2$  presentes na fibra aferente primária, e através de um mecanismo indireto pela ligação em adrenoceptores  $\beta_2$  localizados na membrana de células inflamatórias.

**Palavras-chave:** Articulação Temporomandibular, nocicepção, adrenoceptores beta 2, antiinflamatório não-esteroidal.

## Abstract

Temporomandibular disorders (TMD) are pain conditions that affect the temporomandibular joint (TMJ) and masticatory muscles. These conditions present higher prevalence, severity and duration in females and appear to be associated with inflammation. Although non-steroidal anti-inflammatory drugs have been frequently used in the control of inflammatory pains, many patients may be intolerant to the prolonged treatment and some of them may not respond to the effect of these medications. It is already known that temporomandibular joint receives rich sympathetic innervations that may predominate in the cases less sensitive to the non-steroidal anti-inflammatory drugs. Therefore, in this study we investigated: 1- the presence of  $\beta_2$ -adrenoceptors mRNA in the trigeminal ganglion; 2- whether  $\beta_2$ -adrenoceptors in male rat TMJ modulates temporomandibular nociception; and 3- whether the nociception resulting of  $\beta_2$ -adrenoceptors agonists injection into this joint would be mediated by an indirect mechanism. To quantify the  $\beta_2$ -adrenoreceptors mRNA, 1 hour after the Carrageenan or saline injection in both TMJ the trigeminal ganglion was dissected, mRNA was extracted and Real-Time PCR was realized. To evaluate these adrenoreceptors in the TMJ nociception  $\beta_2$ -adrenoreceptors agonists were administrated with or without selective  $\beta_2$ -adrenoceptors antagonists or glucocorticoid anti-inflammatory agent. The presence of  $\beta_2$ -adrenoreceptors mRNA was found in the trigeminal ganglion suggesting the presence of these adrenoreceptors in the TMJ region. Nociceptive behavior from the administration of  $\beta_2$ -adrenoceptors agonists Salbutamol ou Metaproterenol in the rat TMJ was similar to the nociceptive response in the formalin test. Co-administration of the selective  $\beta_2$ -adrenoceptors antagonists ICI 118.551 or the glucocorticoid anti-inflammatory agent Dexamethasone significantly

reduced Salbutamol or Metaproterenol-induced temporomandibular joint nociception. These findings indicate that  $\beta_2$ -adrenoceptors in the temporomandibular joint region modulate temporomandibular joint pain by a direct action of the catecholamines in the primary afferent neuron and by an indirect action binding in  $\beta_2$ -adrenoreceptors located in the inflammatory cells membrane.

**Keywords:** Temporomandibular joint, nociception, beta 2 adrenoceptors, non-steroidal anti-inflammatory drugs;

## **Introdução**

As disfunções temporomandibulares (DTMs) são condições dolorosas que envolvem a articulação temporomandibular (ATM) e os músculos mastigatórios, e afetam mais de 12% da população (Carlsson, 1999; Dworkin et al., 1990; Von Korff et al., 1988), com maior prevalência, severidade e duração no sexo feminino (Riley and Gilbert, 2001). Essas condições resultam principalmente de trauma agudo, desarranjo interno ou artrites, e são comumente associadas à inflamação aguda ou crônica (Alstergren and Kopp, 2000; Suzuki et al., 2003).

DTMs podem resultar em alodínia e hiperalgesia da ATM, ou seja, um aumento da sensibilidade a estímulos nociceptivos causando dor excessiva e exagerada. Tanto a alodínia quanto a hiperalgesia resultam da sensibilização periférica dos nociceptores locais (Alstergren and Kopp, 2000; Kopp, 2001; Nordahl et al., 2000; Oliveira et al., 2005; Raja et al., 1988) e sensibilização central de neurônios nociceptivos no complexo do gânglio trigeminal (Dubner and Ren, 2004; Iwata et al., 1999; Sessle, 2000). Os processos de sensibilização periférica e central são caracterizados por um aumento da excitabilidade da membrana neural por mediadores inflamatórios liberados no local da lesão (Alstergren and Kopp, 2000; Kopp, 2001; Suzuki et al., 2003) e liberação de neuropeptídeos e aminoácidos excitatórios no gânglio trigeminal (Bakke et al., 1998; Bereiter and Benetti, 1996; Cairns et al., 2001; Yu et al., 1996), respectivamente.

Sabe-se que a dor inflamatória possui um componente simpático (Levine et al., 1986; Nakamura and Ferreira, 1987) que pode predominar em casos com menor sensibilidade aos antiinflamatórios não esteroidais (AINEs).

Dados publicados recentemente (Nackley et al., 2007), demonstram que a inibição da enzima catecol-o-metil-transferase (COMT), que metaboliza as catecolaminas, induz hiperalgesia mecânica e térmica na pata de ratos semelhante à

induzida pela administração do agente inflamatório carragenina. Esse efeito induzido pela inibição da COMT foi bloqueado pela administração conjunta de antagonista de receptor adrenérgico  $\beta_2$  e  $\beta_3$ , mas não de  $\beta_1$ . Esses dados, juntamente com dados previamente publicados (Khasar et al., 1999a; Khasar et al., 1999b; Aley et al., 2001) indicam o envolvimento do adrenoceptor  $\beta_2$  em estados hiperalgésicos e demonstram pela primeira vez a participação dos receptores  $\beta_3$  na hiperalgesia.

Há alguns anos nosso laboratório tem se dedicado ao estudo do envolvimento dos  $\beta$ -adrenoceptores na hiperalgesia da ATM. Por exemplo, demonstramos que as aminas simpatomiméticas são liberadas no local da lesão articular onde contribuem com o desenvolvimento de hiperalgesia na ATM de ratos através da ativação de adrenoceptores  $\beta_2$  localizados nessa região, mas não de adrenoceptores  $\beta_1$  (Rodrigues et al., 2006). Isto se baseia no fato de a depleção dos estoques intracelulares de norepinefrina ou o bloqueio dos adrenoceptores  $\beta_2$  articulares previamente ao desenvolvimento do processo inflamatório atenuar a hiperalgesia da ATM. Em outro trabalho demonstramos que durante a inflamação na ATM de ratos a ativação de adrenoceptores  $\beta_2$ , mas não  $\beta_1$ , localizados na região da ATM, induz a sensibilização necessária para ocorrência de dor pelo fator de crescimento neural (Pelegri-da-Silva et al., 2008). No entanto, não se sabe se os  $\beta$ -adrenoceptores contribuem com a dor instalada da ATM, como, por exemplo, a nocicepção induzida pela administração de agonista de adrenoceptores na ATM de ratos.

Clinicamente, a utilização de beta bloqueadores no tratamento da dor na ATM é um alvo em potencial, uma vez que a ATM possui rica inervação simpática (Widenfalk and Wiberg, 1990; Yoshino et al., 1998; Kido et al., 2001), e a modulação da dor por esta via iria contribuir para o tratamento de pacientes que apresentam dor inflamatória nessa região e que não respondem bem ao uso dos AINEs (Ta and Dionne, 2004).

Recentemente, um estudo clínico demonstrou que mulheres com DTM ou fibromialgia podem apresentar função adrenérgica desregulada, o que contribui com a severidade de dor corporal. Essas mulheres com DTM ou fibromialgia apresentaram uma diminuição do número de sítios dolorosos espalhados pelo corpo, uma diminuição da dor proveniente dessas regiões e uma diminuição da dor induzida por isquemia do braço após a administração endovenosa de beta-bloqueador não seletivo propranolol indicando a participação dos adrenoreceptores  $\beta_1$  e/ou  $\beta_2$  na dor clínica em geral (Light et al., 2009). No entanto, o estudo não avaliou se o propranolol reduz especificamente a dor da ATM.

Os  $\beta$ -bloqueadores já são vastamente utilizados no tratamento da enxaqueca. A enxaqueca e a dor da ATM apresentam algumas características em comum, como por exemplo, tanto a enxaqueca (O'Brien et al., 1994; Stewart et al., 1994; Rasmussen, 1995) quanto à dor da ATM (Dworkin et al., 1990; LeResche, 1997) apresentam maior prevalência, severidade e duração em mulheres, durante o período reprodutivo (Stewart et al., 1992), o que sugere que talvez os beta-bloqueadores possam ser utilizados também com sucesso no tratamento da dor na ATM.

## **Objetivos**

1- Investigar a presença de RNAm de adrenoceptores  $\beta_2$  no gânglio trigeminal;

2- Caracterizar a resposta nociceptiva induzida pela ativação de adrenoceptores  $\beta_2$  na ATM;

1.1. Realização de curvas dose resposta de agonistas de adrenoceptores  $\beta_2$  administrados na região da articulação temporomandibular (ATM);

1.2. Investigar a seletividade dos efeitos induzidos por agonista de adrenoceptores  $\beta_2$ , verificando para isso se a co-administração de doses crescentes de um antagonista seletivo de adrenoceptores  $\beta_2$  com o agonista na região da ATM reverte o efeito do mesmo;

1.3. Verificar se o efeito desencadeado pela administração de agonistas de adrenoceptores  $\beta_2$  na região da articulação temporomandibular é realmente local, através da administração da maior dose utilizada do antagonista na ATM contralateral que receberá a maior dose do agonista;

3- Verificar se a dor induzida pela ativação de adrenoceptores  $\beta_2$  na ATM é mediada por um mecanismo indireto. Para isso será testada a hipótese de que a co-administração de dexametasona com agonista de adrenoceptor  $\beta_2$  reduz a dor na ATM.

## **Justificativa**

Consideramos que a proposta do estudo é relevante, pois o entendimento dos mecanismos periféricos envolvidos na dor da ATM, especialmente os que envolvem a participação de beta adrenoceptores, poderá contribuir com o tratamento da dor associada à disfunção temporomandibular, principalmente no que diz respeito ao tratamento de pacientes que não respondem bem ao tratamento com antiinflamatórios não esteroidais. O trabalho proposto dá continuidade a trabalhos previamente desenvolvidos no laboratório de dor e inflamação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP. O conhecimento sobre a participação dos adrenoceptores  $\beta_2$  na dor da ATM, assim como os mecanismos envolvidos nessa resposta é essencial para o estabelecimento de um tratamento diferenciado, que permitirá manejar a influência da inervação simpática sobre a sintomatologia dolorosa do paciente com DTM e com isso alcançar um maior índice de sucesso no tratamento dessas condições.

## **Materiais e métodos**

### **Animais**

Para realização deste trabalho foram utilizados ratos machos Wistar pesando entre 200 a 300g, provenientes do CEMIB e mantidos no Biotério da FOP - UNICAMP. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas (5 por gaiola) contendo maravalha, em ambiente com controle de luminosidade (ciclos claro/escuro de 12h) com alimentação e água, ad libitum.

Os procedimentos experimentais foram submetidos ao Comitê de Ética de Experimentação Animal da Universidade Estadual de Campinas (protocolo número: 2014-1) e estão de acordo com as diretrizes determinadas pelo Comitê de Ética da Associação Internacional para Estudo da Dor (IASP), em animais conscientes (Zimmermann, 1983). Em particular, a duração dos experimentos foi a menor possível (45 minutos) e o número de animais usados foi mantido ao mínimo necessário (aproximadamente 6 por grupo).

### **Drogas**

- Carragenina (100µg, Oliveira *et al.*, 2005);
- Formalina 1,5% (solução aquosa a 37% de formaldeído) (Clemente *et al.*, 2004);
- Agonista de adrenoceptores  $\beta_2$  Salbutamol 10µg, 40µg e 120µg (Diaz *et al.*, 1996);
- Agonista de adrenoceptores  $\beta_2$  Metaproterenol 0,3µg, 0,9µg, 2,7µg e 8,1µg (Pascual *et al.*, 1993);

- Antagonista seletivo de receptores adrenérgicos  $\beta_2$  ICI 118.551 (hydrochloride (( $\pm$ )-1-[2,3-(dihydro-7-methyl-1H-inden-4-y)oxy]-3-[(1-methylethyl)amino]-2-butanol hydrochloride)) 0,1 $\mu$ g, 0,3 $\mu$ g e 0,9 $\mu$ g (Vandenput et al., 2002);

- Antiinflamatório Esteroidal Dexametasona 5 $\mu$ g (Yang et al., 1997);

Todas as drogas foram utilizadas em um volume de 15 $\mu$ L, diluídas em solução salina a 0,9% e adquiridas da Sigma–SP, Brasil.

### **Delineamento experimental**

Com o objetivo de verificar a presença de RNAm de adrenoceptores  $\beta_2$  no gânglio trigeminal foram realizados os seguintes grupos:

- administração de salina na ATM e dissecação do gânglio após 1 hora para procedimentos de Real-Time PCR;

- administração de Carragenina na ATM e dissecação do gânglio após 1 hora para procedimentos de Real-Time PCR;

Com o objetivo de verificar se a administração de agonistas para adrenoceptores  $\beta_2$  na região da ATM induz nocicepção realizamos os seguintes grupos experimentais:

- agonista de adrenoceptores  $\beta_2$  Salbutamol;

- agonista de adrenoceptores  $\beta_2$  Metaproterenol;

Para comprovar a seletividade do agonista  $\beta_2$  adrenérgico na dose efetiva utilizada, verificamos se o antagonista seletivo de adrenoceptores  $\beta_2$  ICI 118.551 reverte o efeito desencadeado pelo agonista:

- Salbutamol (dose efetiva) + o antagonista seletivo do adrenoceptores  $\beta_2$  ICI 118.551;

- Metaprotereno (dose efetiva) + o antagonista seletivo do adrenoceptores  $\beta_2$  ICI 118.551;

Para comprovar se o efeito do antagonista  $\beta_2$  adrenérgico na dose efetiva é realmente periférico e local, o antagonista de adrenoceptor  $\beta_2$  ICI 118.551 foi administrado na ATM contralateral a que recebeu a administração do agonista de adrenoceptores  $\beta_2$  Salbutamol:

- Salbutamol (dose efetiva) + ICI 118.551 na ATM contralateral;
- Metaproterenol (dose efetiva) + ICI 118.551 na ATM contralateral;

Com o objetivo de determinar se a dor induzida pela atividade de adrenoceptores  $\beta_2$  na ATM é mediada por um mecanismo indireto foi co-administrada Dexametasona com os agonistas de adrenoceptores  $\beta_2$ :

- Salbutamol (dose efetiva) + Dexametasona.
- Metaproterenol (dose efetiva) + Dexametasona.

### **Administração de drogas na região da ATM**

Os animais foram brevemente anestesiados por inalação de Isoflurano. A seguir, uma agulha calibre 30, conectada a uma seringa de microlitro Hamilton, por um tubo de polietileno P50, foi inserida na porção inferior da borda póstero-inferior do arco zigomático, sendo avançada em direção anterior até contactar a região póstero-lateral do cêndilo (Roveroni et al., 2001). O volume de injeção foi de 15 $\mu$ l por droga.

### **Teste comportamental**

As sessões de teste foram realizadas durante a fase clara entre 9h e 17h em sala silenciosa, com temperatura ambiente mantida a 25°C. Durante o teste os animais não tiveram acesso à água ou à comida. Para minimizar o estresse durante as sessões

experimentais, os animais foram previamente manipulados pelo pesquisador por um período de 7 dias. Para a realização das análises comportamentais uma caixa de observação medindo 30x30x30 cm com base e 3 laterais espelhadas e frente de vidro foi utilizada. Cada animal foi inicialmente colocado e mantido na caixa por 10 minutos para habituar-se ao ambiente de experimentação e minimizar o estresse.

Imediatamente após a injeção periarticular o animal já consciente foi recolocado na câmara de observação e as respostas comportamentais caracterizadas pelo ato de coçar a região injetada com a pata dianteira ou traseira e pelo ato de levantar reflexamente a cabeça foram quantificadas durante 45 minutos, divididos em 9 blocos de 5 minutos. O tempo em segundos que o animal permaneceu coçando a região orofacial foi quantificado através da utilização de um cronômetro, e o número de vezes que o animal levantou reflexamente a cabeça foi quantificado por um contador de células (Roveroni et al., 2001). Considerando que o ato de levantar reflexamente a cabeça segue um padrão uniforme de 1 s de duração, a intensidade da resposta nociceptiva foi quantificada somando-se esse comportamento ao ato de coçar a região injetada, como previamente padronizado (Roveroni et al., 2001).

### **Confirmação do local da injeção**

Após o término de cada análise comportamental foi feita a confirmação visual do local de administração das drogas (pos-mortem). Para isso, após indução anestésica através da administração intraperitoneal de uma mistura de uretano e  $\alpha$ -cloralose (100mg/kg e 50mg/kg, respectivamente), o corante azul de Evans (1%; 5mg/Kg) foi injetado, intracardiamente. Após dez minutos, o animal foi submetido à perfusão cardíaca com soro fisiológico. Como o corante Azul de Evans se liga às proteínas

plasmáticas, o local da injeção pode ser identificado visualmente, de acordo com a aparência do corante extravasado (Haas et al., 1992).

### **Dissecação dos gânglios trigeminais e extração do RNAm**

Uma hora após a injeção de Carragenina ou salina nas duas ATMs, foi feita anestesia do animal através da inalação de Isoflurano e sua decapitação. O cérebro foi removido e os gânglios trigeminais dissecados do osso petroso na base da fossa mediana do crânio. Os gânglios foram irrigados com solução salina fria e estéril e acondicionados em tubos contendo solução para evitar a degradação do RNA (RNAlater<sup>®</sup> Ambion Inc., Austin, TX) a -70°C. O RNA total foi extraído dos gânglios pelo método do reagente TRIZOL (Gibco BRL, life Technologies, Rockvill, MD, USA) seguindo as recomendações do fabricante, descritas brevemente como segue: a solução de RNAlater foi aspirada e 3ml de reagente TRIZOL adicionado ao tubo com os gânglios, agitado por 30 segundos e incubado por 5 minutos em temperatura ambiente. Após este período, 0,6ml de clorofórmio (Sigma, St. Louis, MO, USA) foi adicionado ao tubo, agitado (vortex) e centrifugado (10.000 rpm por 15 minutos a 4°C). A porção aquosa foi transferida para outro tubo ao qual foi adicionado 1,5ml de isopropanol, agitado, incubado por 20 minutos a uma temperatura de -20°C e centrifugado da mesma forma que descrito acima. O “pellet” foi lavado com etanol gelado a 75% e seco em temperatura ambiente. As amostras de RNA foram resuspendidas em 50ml de água tratada com dietilpirocarbonato e armazenadas a -70°C. A concentração de RNA foi determinada com a utilização de um espectrofotômetro (Eppendorf AG, Hamburg, Germany).

### **“Real-Time” PCR (RT-PCR)**

Transcrição reversa: o RNA total foi tratado para eliminação de qualquer resíduo de DNA da amostra (DNA-freeT, Ambion Inc., Austin, TX, USA), e 1mg da mostra foi utilizado para a síntese de cDNA. Para isso, as reações foram realizadas utilizando-se o kit “first-strand” cDNA synthesis (Roche Diagnostic Co., Indianópolis, IN, USA), seguindo as recomendações do fabricante para um volume final de 20 µl. As amostras foram incubadas por 10 minutos a 25°C e então por 60 minutos a 42°C. Concluído o segundo ciclo de incubação, as amostras foram incubadas por 5 minutos a 99°C e então incubadas por 5 minutos a 4°C para resfriamento. Os reagentes utilizados e suas respectivas concentrações foram: solução tampão (1X), MgCl<sub>2</sub> (5mM), mistura de deoxinucleotídeos (1mM), “primers” randomizados – p[dN]6 (3,2mg), inibidor de RNase (50U) e transcriptase reversa – AMV (20U).

Desenho dos “primers”: os “primers” para GAPDH (gene de referência) e para adrenoceptores  $\beta_2$  foram desenhados com auxílio de um programa desenvolvido especificamente para desenhar “primers” para o LightCycler (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Germany). Todos os “primers” foram verificados quanto à sua especificidade através da verificação da curva de Melting (obtida após a corrida no LightCycler) e correndo gel para verificação dos produtos.

Otimização das reações: a eficiência das reações para cada “primer” foi otimizada anteriormente ao início das reações propriamente ditas. Concentrações variando de 2 a 5mM de MgCl<sub>2</sub> e de 0,2 a 0,5mM de cada “primer” foram utilizadas para se determinar em quais condições a reação teve a melhor eficiência. Condições essas sugeridas pelo fabricante do equipamento.

Reações de RT-PCR: as reações de RT-PCR foram realizadas com o sistema LightCycler (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), utilizando-se o kit

"FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostic Co.)". O perfil das reações foi determinado seguindo as recomendações do fabricante do equipamento. Para cada uma das "corridas", a água foi utilizada como controle negativo, e o produto das reações foi quantificado utilizando-se o programa do próprio fabricante (LightCycler Relative Quantification Software - Roche Diagnostics GmbH). GAPDH foi utilizado como o gene de referência ("housekeeping") para a normalização dos valores.

### **Análise estatística**

Os comportamentos nociceptivos registrados durante os 45 minutos de observação foram somados e utilizados em todas as análises estatísticas. Dados com homogeneidade de variância foram analisados pelo teste t ou ANOVA e as comparações múltiplas foram realizadas pelo teste de Tukey. Os resultados foram apresentados pela média  $\pm$  epm e o nível de significância de  $p < 0.05$  foi utilizado.

## **Resultados**

### *Expressão de RNAm de adrenoceptores $\beta_2$ no Gânglio Trigeminal*

Com o intuito de verificar se adrenoceptores  $\beta_2$  estão presentes no Gânglio Trigeminal, Carragenina ou seu veículo salina foram administrados na região da ATM de ratos machos 1 hora antes da remoção do cérebro para dissecação de ambos os gânglios trigeminiais direito e esquerdo para serem utilizados na análise quantitativa de Real-Time PCR. A expressão de RNAm para adrenoceptores  $\beta_2$  no Gânglio Trigeminal foi significativamente maior quando administrada Carragenina comparando-se com seu veículo ( $p < 0,05$ , teste de Tukey, Fig. 1), sugerindo a presença desses adrenoceptores nesta região.

### *Efeito da administração de Salbutamol e de Metaproterenol na ATM de ratos*

Com o intuito de verificar se adrenoceptores  $\beta_2$  contribuem na indução da nocicepção da ATM, agonistas seletivos para adrenoceptores  $\beta_2$  Salbutamol ou Metaproterenol foram administrados na ATM de ratos. Salbutamol e Metaproterenol apresentaram de forma dose dependente um comportamento nociceptivo significativamente similar àquele apresentado no teste da formalina ( $p > 0,05$ , pós-teste de Tukey, Fig. 2 e 3).

### *Efeito do antagonista de adrenoceptores $\beta_2$ no comportamento nociceptivo induzido por Salbutamol ou por Metaproterenol*

Com o intuito de verificar se a participação de adrenoceptores  $\beta_2$  na nocicepção ocorre de forma seletiva, o antagonista de adrenoceptores  $\beta_2$  ICI 118.551 foi co-administrado com a maior dose de Salbutamol ou Metaproterenol na ATM de ratos. A maior dose de ICI 118.551 reduziu significativamente a resposta nociceptiva induzida

pelo Salbutamol ou Metaproterenol ( $p < 0.05$ , pós-teste de Tukey, Fig. 4 e 5). ICI 118.551 não afetou a nocicepção induzida pelo Salbutamol ou Metaproterenol quando administrado na ATM contralateral (Fig. 4 e 5,  $p > 0.05$ , t test), confirmando sua ação local. Co-administração de ICI 118.551 com NaCl 0,9% não apresentou resposta nociceptiva por si só sendo similar àquela induzida pela injeção de NaCl 0,9% na ATM (Fig. 4 e 5,  $p > 0.05$ , teste t).

*Efeito do antiinflamatório glicocorticóide Dexametasona no comportamento nociceptivo induzido pelo Salbutamol ou Metaproterenol*

Com o intuito de verificar se células inflamatórias contribuem com a nocicepção induzida pelo Salbutamol ou Metaproterenol, antiinflamatório Dexametasona foi co-administrado com a maior dose de Salbutamol ou Metaproterenol (120 $\mu$ g e 8,1 $\mu$ g, respectivamente) na ATM de machos. A menor dose de Dexametasona (5,0 $\mu$ g) diminuiu significativamente a resposta nociceptiva induzida pelo Salbutamol ou Metaproterenol em machos ( $p < 0.05$ , teste de Tukey, Fig. 6 e 7). Dexametasona não afetou a nocicepção induzida pelo Salbutamol ou Metaproterenol quando aplicada na ATM contralateral (Fig. 6 e 7,  $p > 0.05$ , teste t), confirmando seu efeito local e periférico. Co-administração de Dexametasona com NaCl 0,9% não apresentou resposta nociceptiva por si só sendo a resposta similar àquela induzida pela injeção de apenas NaCl 0,9% na ATM (Fig. 6 e 7,  $p > 0.05$ , teste t).

## Discussão

Neste estudo demonstramos a presença de RNAm de adrenoceptores  $\beta_2$  no Gânglio Trigeminal embora RNAm desses adrenoceptores não tenham sido detectados no Gânglio da Raiz Dorsal (Nicholson, 2005). Este dado sugere que a ação da nociceção na ATM através da ativação de adrenoceptores  $\beta_2$  é provavelmente mediada por mecanismos periféricos no gânglio trigeminal além dos mecanismos intrínsecos na medula espinhal (Bondok, 1988; Peng, 1993; Nicholson, 2005; Han et al, 2007).

Neste estudo pudemos demonstrar que a administração de agonistas de adrenoceptores  $\beta_2$  Salbutamol ou Metaproterenol induz um comportamento nociceptivo semelhante àquele provocado pela administração de Formalina na ATM; este comportamento nociceptivo provocado pelo Salbutamol ou Metaproterenol foi significativamente reduzido pela administração concomitante de antagonista de adrenoceptores  $\beta_2$  ICI 118.551, demonstrando a seletividade destes adrenoceptores. Com relação à participação das catecolaminas em estados hiperalgésicos tem sido demonstrado que a inibição da catecol-o-metil-transferase (COMT), que metaboliza as catecolaminas, induz hiperalgesia mecânica e térmica na pata de ratos semelhante à induzida pela administração do agente inflamatório carragenina. Esse efeito induzido pela inibição da COMT foi bloqueado pela administração conjunta de antagonista de receptor adrenérgico  $\beta_2$  e  $\beta_3$ , mas não de  $\beta_1$ . Esses dados, juntamente com dados previamente publicados (Khasar et al., 1999a; Khasar et al., 1999b; Aley et al., 2001) indicam o envolvimento do adrenoceptor  $\beta_2$  em estados hiperalgésicos e demonstram pela primeira vez a participação dos receptores  $\beta_3$  na hiperalgesia; na região da ATM, demonstramos que as aminas simpatomiméticas são liberadas no local da lesão articular onde contribuem com o desenvolvimento de hiperalgesia na ATM de ratos através da ativação de adrenoceptores  $\beta_2$  localizados nessa região, mas não de adrenoceptores  $\beta_1$

(Rodrigues et al., 2006). Em outro trabalho demonstramos que durante a inflamação na ATM de ratos a ativação de adrenoceptores  $\beta_2$ , mas não  $\beta_1$ , localizados na região da ATM, induz a sensibilização necessária para ocorrência de dor pelo fator de crescimento neural (Pelegri-da-Silva et al., 2008). Estes dados juntamente com os dados encontrados neste trabalho demonstram que adrenoceptores  $\beta_2$  participam tanto da hiperalgesia quanto da dor já instalada da ATM; desta forma, os mecanismos que medeiam a hiperalgesia podem ser tanto separados e distintos daqueles que medeiam a nocicepção (Taiwo and Levine, 1991; Waldron and Sawynok, 2004; Oliveira et al., 2007), quanto mecanismos comuns podem estar envolvidos. Nossos resultados demonstrando que a ativação de adrenoceptores  $\beta_2$  articulares aumentam significativamente a nocicepção da ATM indicam que catecolaminas contribuem para o desenvolvimento da nocicepção através da ativação de adrenoceptores presentes na região da ATM. Este resultado é consistente com a densa inervação simpática da ATM por fibras vindas de células do gânglio cervical superior (Widenfalk and Wiberg, 1990; Yoshino et al., 1998; Kido et al., 2001) de onde provavelmente as catecolaminas são liberadas. Este componente simpático da inflamação da ATM pode estar predominando em alguns pacientes que apresentam dor na ATM e talvez explique porque alguns desses pacientes não respondem ao tratamento analgésico com AINES.

Estão crescendo as evidências de que o início de Desordens Idiopáticas Dolorosas (Idiopathic Pain Disorders - IPDs), como as DTMs, está associado com fatores físicos e psicológicos que iniciariam uma amplificação da dor e do estresse psicológico. No entanto, cada indivíduo desenvolve estas condições com diferentes probabilidades, as quais são definidas através de uma interação complexa entre os fatores genéticos e a extensão da exposição à eventos ambientais específicos (Diatchenko et al., 2006). Atualmente, novas evidências sugerem a existência de bases

genéticas para a participação de adrenoceptores beta no desencadeamento das DTMs. Em um estudo prospectivo do desenvolvimento de DTM, estudou-se 3 variantes genéticas (haplotipos) para a codificação genética da enzima Catecol-O-methyltransferase (COMT), enzima responsável pela metabolização das catecolaminas, entre elas a Norepinefrina, Epinefrina e a Dopamina. O haplotipo ligado à menor atividade da COMT foi associado com a maior sensibilidade dolorosa e o maior risco de desenvolvimento de DTM (Diatchenko et al., 2006). Isto se deve a diferentes combinações de alelos comuns observados na região que codifica o gene da COMT em humanos, afetando significativamente a estrutura secundária do RNAm correspondente, o que por sua vez causa alterações dramáticas na eficiência da enzima alterando suas funções essenciais (Nackley, 2010).

Clinicamente, tem sido demonstrado que mulheres com DTM possuem função adrenérgica desregulada (Light et al., 2009) o que sugere que tanto a desregulação positiva ou negativa na função de adrenoceptores  $\beta_2$  aumentam a vulnerabilidade para o desenvolvimento desta condição (Diatchenko et al., 2007). Em outro estudo, mulheres que apresentavam fibromialgia (Light et al., 2009) ou DTM (Tchivileva, 2010) apresentaram uma diminuição do número de sítios dolorosos espalhados pelo corpo, uma diminuição da dor proveniente dessas regiões e uma diminuição da dor induzida por isquemia do braço após a administração endovenosa de beta-bloqueador não seletivo propranolol indicando a participação dos adrenoceptores  $\beta_1$  e/ou  $\beta_2$  na dor clínica em geral (Light et al., 2009).

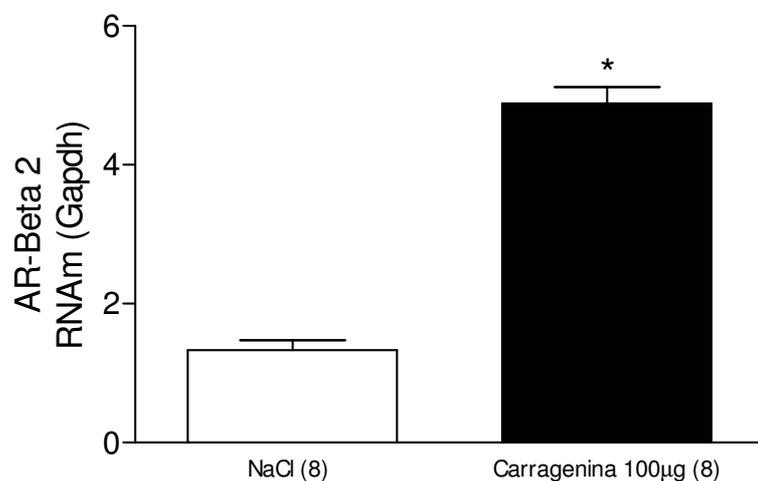
Neste estudo também demonstramos que a ativação de adrenoceptores  $\beta_2$  da região da ATM por agonistas de receptores  $\beta_2$  induz à nocicepção desta região através da liberação de mediadores inflamatórios. Enquanto a presença de RNA de beta adrenoceptores ou sítios de ligação em neurônios nociceptivos trigeminais ou gânglios

trigeminais poderiam suportar a hipótese de que as catecolaminas contribuem para a nocicepção induzida pelo agonista de receptores  $\beta_2$  na ATM através de uma ação direta dessas aminas no terminal nociceptivo aferente primário, a expressão de adrenoceptores beta em macrófagos (Barnes, 1993; Tan, 2007), monócitos, linfócitos T (Johnson, 2002), eosinófilos, mastócitos, neutrófilos (Barnes, 1993; Johnson, 2002), linfócitos, (Barnes, 1993) e basófilos (Perper et al., 1972) suportam a hipótese de uma ação indireta dessas aminas no terminais nociceptivos aferentes primários.

Assim, os resultados presentes sugerem que adrenoceptores  $\beta_2$  da ATM de ratos participam na modulação da dor inflamatória. A ativação desses adrenoceptores resulta em um comportamento nociceptivo da ATM em ratos machos e quando co-administrado com antagonistas de adrenoceptores  $\beta_2$  ocorre supressão desta resposta. Clinicamente, os  $\beta$ -bloqueadores já são vastamente utilizados no tratamento de enxaqueca. A enxaqueca e a dor da ATM apresentam algumas características em comum como, por exemplo, tanto a enxaqueca (O'Brien et al., 1994; Stewart et al., 1994; Rasmussen, 1995) quanto à dor da ATM (Dworkin et al., 1990; LeResche, 1997) apresentam maior prevalência, severidade e duração em mulheres, durante o período reprodutivo (Stewart et al., 1992). Assim, tendo em vista as evidências de que muitos pacientes são intolerantes ao tratamento prolongado com AINEs e nem todos os pacientes respondem aos efeitos de tais medicamentos, estes resultados sugerem que antagonistas de beta adrenoceptores poderiam ser uma alternativa no tratamento de dores relacionadas às Disfunções Temporomandibulares.

## Figuras e legendas

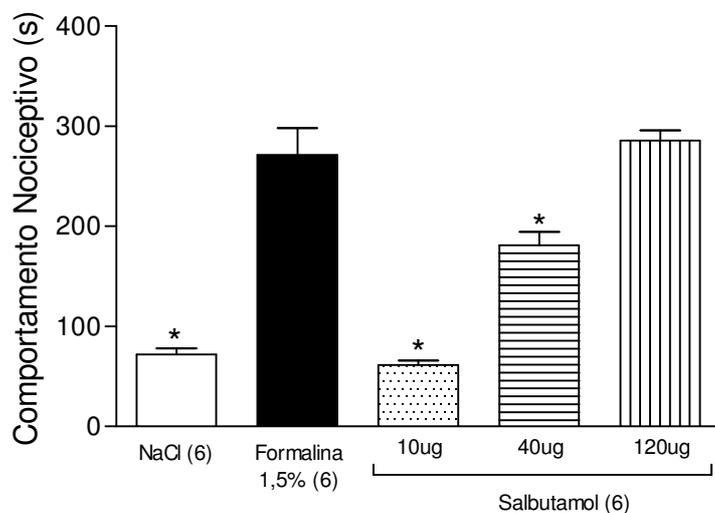
**Figura 1**



*Fig. 1 – Expressão de RNAm de adrenoceptores  $\beta_2$  no Gânglio Trigeminal de ratos machos.*

Administração de Carragenina 100µg na ATM de ratos machos induziu a expressão de RNAm de adrenoceptores  $\beta_2$  no Gânglio Trigeminal significativamente maior que a administração de seu veículo. O símbolo “\*” indica uma resposta significativamente maior que aquela causada pela salina. O número de ratos utilizados está entre parênteses ( $p < 0.05$ , teste de Tukey).

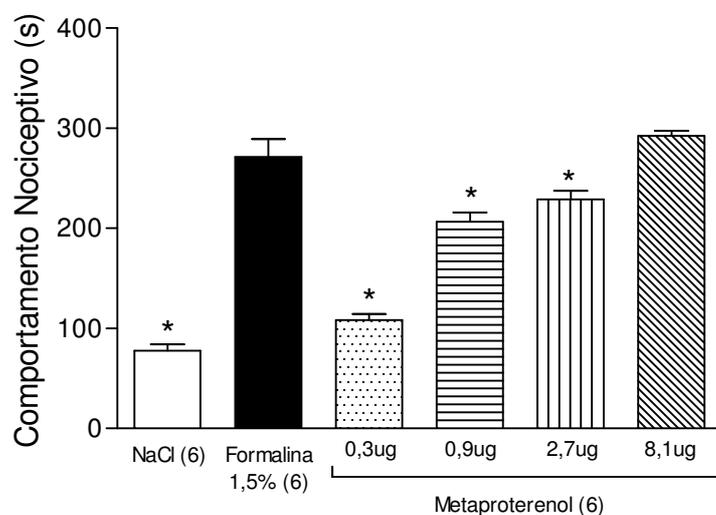
**Figura 2**



*Fig. 2 – efeito de diferentes concentrações de Salbutamol na ATM de ratos machos.*

Administração de Salbutamol nas concentrações de 10 $\mu$ g, 40 $\mu$ g e 120 $\mu$ g na ATM de ratos machos. Salbutamol 120 $\mu$ g induziu comportamento nociceptivo significativamente similar ao do teste da Formalina ( $p > 0.05$ , teste de Tukey). O símbolo “\*” indica uma resposta significativamente menor que a resposta apresentada pela injeção de Formalina e Salbutamol 120 $\mu$ g ( $p < 0.05$ , ANOVA pós-teste de Tukey). O número de animais utilizados está entre parênteses.

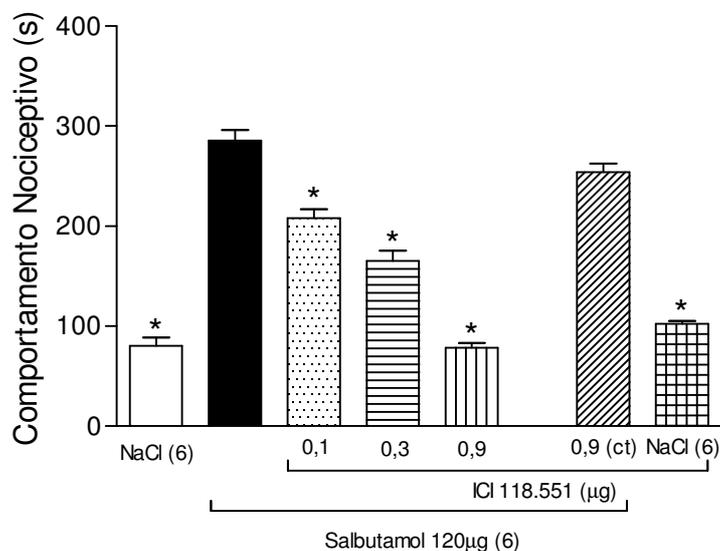
**Figura 3**



*Fig. 3 – efeito de diferentes concentrações de Salbutamol na ATM de ratos machos.*

Administração de Metaproterenol nas concentrações de 0,3 $\mu$ g, 0,9 $\mu$ g, 2,7 $\mu$ g e 8,1 $\mu$ g na ATM de ratos machos. Metaproterenol 8,1 $\mu$ g induziu comportamento nociceptivo significativamente similar ao do teste da Formalina ( $p > 0.05$ , teste de Tukey). O símbolo “\*” indica uma resposta significativamente menor que a resposta apresentada pela injeção de Formalina e Metaproterenol 8,1 $\mu$ g ( $p < 0.05$ , ANOVA pós-teste de Tukey). O número de animais utilizados está entre parênteses.

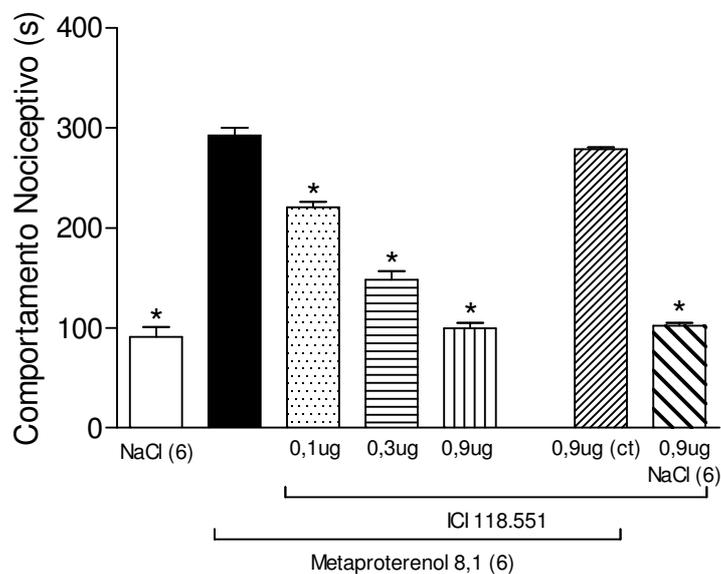
**Figura 4**



*Fig. 4 – Efeito da administração local na ATM de antagonista de adrenoceptores  $\beta_2$  ICI118.551 no comportamento nociceptivo induzido por Salbutamol em machos.*

Co-administração de ICI118.551 nas concentrações de 0,1µg, 0,3µg e 0,9µg com Salbutamol 120µg reduziu significativamente a nocicepção induzida por Salbutamol em machos. O símbolo “\*” indica uma resposta significativamente menor que a resposta apresentada pela injeção de Salbutamol 120µg ( $p < 0.05$ , ANOVA pós-teste de Tukey). Co-administração de ICI118.551 (0,9µg) com NaCl 0.9% não teve efeito por si só ( $p > 0.05$ , teste t). Administração de ICI118.551 (0,9µg) na ATM contralateral (ct) não afetou o comportamento nociceptivo induzido por Salbutamol ( $p > 0.05$ , teste t).

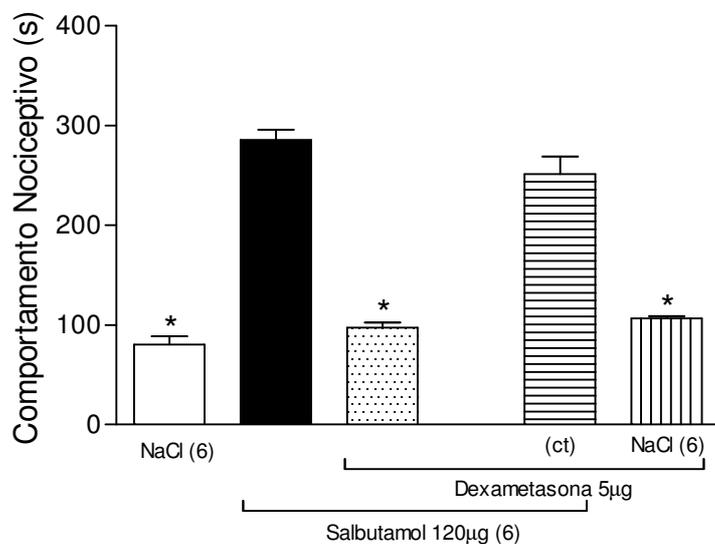
**Figura 5**



*Fig. 5 – Efeito da administração local na ATM de antagonista de adrenoceptores  $\beta_2$  ICI118.551 no comportamento nociceptivo induzido por Metaproterenol em machos.*

Co-administração de ICI118.551 nas concentrações de 0,1 $\mu$ g, 0,3 $\mu$ g e 0,9 $\mu$ g com Metaproterenol 8,1 $\mu$ g reduziu significativamente a nocicepção induzida por Metaproterenol em machos. O símbolo “\*” indica uma resposta significativamente menor que a resposta apresentada pela injeção de Metaproterenol 8,1 $\mu$ g ( $p < 0.05$ , ANOVA pós-teste de Tukey). Co-administração de ICI118.551 (0,9 $\mu$ g) com NaCl 0.9% não teve efeito por si só ( $p > 0.05$ , teste t). Administração de ICI118.551 (0,9 $\mu$ g) na ATM contralateral (ct) não afetou o comportamento nociceptivo induzido por Metaproterenol ( $p > 0.05$ , teste t).

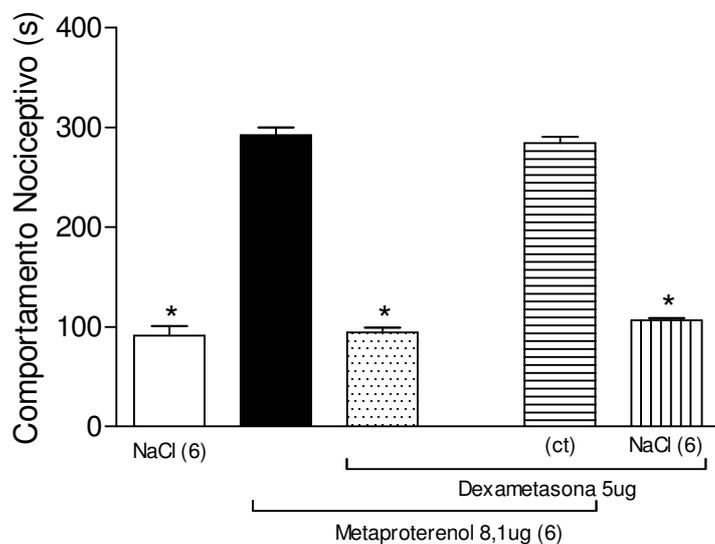
**Figura 6**



*Fig. 6 – Efeito da administração local na ATM de antiinflamatório glicocorticóide Dexametasona na nocicepção induzida pelo Salbutamol em machos.*

Co-administração de Dexametasona (5µg) com Salbutamol 120µg reduziu significativamente o comportamento nociceptivo induzido por Salbutamol em machos. O símbolo “\*” indica uma resposta significativamente menor que a resposta apresentada pela injeção de Salbutamol 120µg ( $p < 0.05$ , ANOVA pós-teste de Tukey). Co-administração de Dexametasona (5µg) com NaCl 0.9% não demonstrou efeito ( $p > 0.05$ , teste t). Administração de Dexametasona (5µg) na ATM contralateral (ct) não afetou o comportamento nociceptivo induzido por Salbutamol ( $p > 0.05$ , teste t).

**Figura 7**



*Fig. 7 – Efeito da administração local na ATM de antiinflamatório glicocorticoide Dexametasona na nocicepção induzida pelo Metaproterenol em machos.*

Co-administração de Dexametasona (5 $\mu$ g) com Metaproterenol 8,1 $\mu$ g reduziu significativamente o comportamento nociceptivo induzido por Metaproterenol em machos. O símbolo “\*” indica uma resposta significativamente menor que a resposta apresentada pela injeção de Metaproterenol 8,1 $\mu$ g ( $p < 0.05$ , ANOVA pós-teste de Tukey). Co-administração de Dexametasona (5 $\mu$ g) com NaCl 0.9% não demonstrou efeito ( $p > 0.05$ , teste t). Administração de Dexametasona (5 $\mu$ g) na ATM contralateral (ct) não afetou o comportamento nociceptivo induzido por Metaproterenol ( $p > 0.05$ , teste t).

## **Conclusões**

O presente trabalho demonstrou que adrenoceptores  $\beta_2$  estão presentes na região da Articulação Temporomandibular e participam da nocicepção da ATM de ratos. Estes adrenoceptores modulam a dor na ATM através de um mecanismo direto das catecolaminas atuando diretamente em neurônios aferentes primários, e por meio de um mecanismo indireto através da ligação de catecolaminas à adrenoceptores  $\beta_2$  presentes na membrana de células inflamatórias. Os dados obtidos sugerem que os beta-bloqueadores, em especial aqueles seletivos para adrenoceptores  $\beta_2$ , podem ser uma alternativa interessante no tratamento de pacientes com dor da ATM que apresentam intolerância ao tratamento prolongado com antiinflamatórios não esteroidais ou que simplesmente não respondem aos seus efeitos.

## Referências bibliográficas

Alstergren, P. and Kopp, S.: Prostaglandin E2 in temporomandibular joint synovial fluid and its relation to pain and inflammatory disorders. *J Oral Maxillofac Surg.* 58 (2):180-6; discussion 186-8, 2000.

Bakke, M.; Hu, J.W. and Sessle, B.J.: Involvement of NK-1 and NK-2 tachykinin receptor mechanisms in jaw muscle activity reflexly evoked by inflammatory irritant application to the rat temporomandibular joint. *Pain.* 75 (2-3):219-27, 1998.

Bereiter, D.A. and Benetti, A.P.: Excitatory amino release within spinal trigeminal nucleus after mustard oil injection into the temporomandibular joint region of the rat. *Pain.* 67 (2-3):451-9, 1996.

Cairns, B.E.; Sessle, B.J. and Hu, J.W.: Temporomandibular-evoked jaw muscle reflex: role of brain stem NMDA and non-NMDA receptors. *Neuroreport.* 12 (9):1875-8, 2001.

Carlsson, G.E.: Epidemiology and treatment need for temporomandibular disorders. *J Orofac Pain.* 13 (4):232-7, 1999.

Diaz, B.L.; Serra, M.F.; Alves, A.C.; Cordeiro, S.B.; Martins, M.A. and e Silva, P.M.: Local exposure to salbutamol or Bt2 cyclic AMP inhibits pleural exudation and leukocyte influx caused by antigen in rats. *Eur J Pharmacol.* 296 (2):173-80, 1996.

Dubner, R. and Ren, K.: Brainstem mechanisms of persistent pain following injury. *J Orofac Pain.* 18 (4):299-305, 2004.

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

Haas, D.A.; Nakanishi, O.; MacMillan, R.E.; Jordan, R.C. and Hu, J.W.: Development of an orofacial model of acute inflammation in the rat. *Arch Oral Biol.* 37 (5):417-22, 1992.

Iwata, K.; Tashiro, A.; Tsuboi, Y.; Imai, T.; Sumino, R.; Morimoto, T.; Dubner, R. and Ren, K.: Medullary dorsal horn neuronal activity in rats with persistent temporomandibular joint and perioral inflammation. *J Neurophysiol.* 82 (3):1244-53, 1999.

Kopp, S.: Neuroendocrine, immune, and local responses related to temporomandibular disorders. *J Orofac Pain.* 15 (1):9-28, 2001.

Levine, J.D.; Taiwo, Y.O.; Collins, S.D. and Tam, J.K.: Noradrenaline hyperalgesia is mediated through interaction with sympathetic postganglionic neurone terminals rather than activation of primary afferent nociceptors. *Nature*. 323 (6084):158-60, 1986.

Nackley, A.G.; Diatchenko, L.: Assessing potential functionality of catechol-O-methyltransferase (COMT) polymorphisms associated with pain sensitivity and temporomandibular joint disorders. *Methods Mol Biol*. 2010;617:375-93.

Nakamura, M. and Ferreira, S.H.: A peripheral sympathetic component in inflammatory hyperalgesia. *Eur J Pharmacol*. 135 (2):145-53, 1987.

Nicholson, L.J.; Philippe, M.; Paine, A.J.; Mann, D.A. and Dolphin, C.T.: RNA interference mediated in human primary cells via recombinant baculoviral vectors. *Mol Ther*. 11 (4):638-44, 2005.

Nordahl, S.; Alstergren, P. and Kopp, S.: Tumor necrosis factor-alpha in synovial fluid and plasma from patients with chronic connective tissue disease and its relation to temporomandibular joint pain. *J Oral Maxillofac Surg*. 58 (5):525-30, 2000.

Oliveira, M.C.; Parada, C.A.; Veiga, M.C.; Rodrigues, L.R.; Barros, S.P. and Tambeli, C.H.: Evidence for the involvement of endogenous ATP and P2X receptors in TMJ pain. *Eur J Pain*. 9 (1):87-93, 2005.

Pascual, M.; Del Barrio, A.S.; Portillo, M.P.; Martinez, J.A. and Larralde, J.: Tissue protein turnover in animals treated with the mixed beta-agonist metaproterenol: influence of dose, route and pattern of administration. *Biochimie*. 75 (10):879-83, 1993.

Raja, S.N.; Meyer, R.A. and Campbell, J.N.: Peripheral mechanisms of somatic pain. *Anesthesiology*. 68 (4):571-90, 1988.

Riley, J.L., 3rd and Gilbert, G.H.: Orofacial pain symptoms: an interaction between age and sex. *Pain*. 90 (3):245-56, 2001.

Rodrigues, L.L.; Oliveira, M.C.; Pelegrini-da-Silva, A.; de Arruda Veiga, M.C.; Parada, C.A. and Tambeli, C.H.: Peripheral sympathetic component of the temporomandibular joint inflammatory pain in rats. *J Pain*. 7 (12):929-36, 2006.

Roveroni, R.C.; Parada, C.A.; Cecilia, M.; Veiga, F.A. and Tambeli, C.H.: Development of a behavioral model of TMJ pain in rats: the TMJ formalin test. *Pain*. 94 (2):185-91, 2001.

Sessle, B.J.: Acute and chronic craniofacial pain: brainstem mechanisms of nociceptive transmission and neuroplasticity, and their clinical correlates. *Crit Rev Oral Biol Med*. 11 (1):57-91, 2000.

Sun J, Kim SJ, Park MK, Kim HJ, Tsoy I, Kang YJ, Lee YS, Seo HG, Lee JH, Chang KC: Selective activation of adrenergic beta1 receptors induces heme oxygenase 1 production in RAW264.7 cells. *FEBS Lett* Oct 24;579(25):5494-500, 2005.

Suzuki, T.; Segami, N.; Nishimura, M.; Sato, J. and Nojima, T.: Bradykinin expression in synovial tissues and synovial fluids obtained from patients with internal derangement of the temporomandibular joint. *Cranio*. 21 (4):265-70, 2003.

Vandenput, L.; Boonen, S.; Van Herck, E.; Swinnen, J.V.; Bouillon, R. and Vanderschueren, D.: Evidence from the aged orchidectomized male rat model that 17beta-estradiol is a more effective bone-sparing and anabolic agent than 5alpha-dihydrotestosterone. *J Bone Miner Res*. 17 (11):2080-6, 2002.

Von Korff, M.; Dworkin, S.F.; Le Resche, L. and Kruger, A.: An epidemiologic comparison of pain complaints. *Pain*. 32 (2):173-83, 1988.

Wallin G, Torebjork E, Hallin R: Preliminary observations on the pathophysiology of hyperalgesia in the causalgic pain syndrome. In: Y. Zotterman, ed., *Sensory Functions of the Primate. Skin with Special Reference to Man*. Oxford, Pergamon 409-502, 1976.

Yang, Y.; Leech, M.; Hutchinson, P.; Holdsworth, S.R. and Morand, E.F.: Antiinflammatory effect of lipocortin 1 in experimental arthritis. *Inflammation*. 21 (6):583-96, 1997.

Yu, X.M.; Sessle, B.J.; Haas, D.A.; Izzo, A.; Vernon, H. and Hu, J.W.: Involvement of NMDA receptor mechanisms in jaw electromyographic activity and plasma extravasation induced by inflammatory irritant application to temporomandibular joint region of rats. *Pain*. 68 (1):169-78, 1996.

Zimmermann, M.: Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*. 16 (2):109-10, 1983.

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



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA/Unicamp

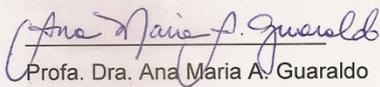
CERTIFICADO

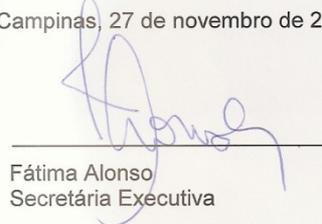
Certificamos que o Protocolo nº 2014-1, sobre "Papel dos adrenoceptores beta na nocicepção induzida por formalina na ATM de ratos", sob a responsabilidade de Profa. Dra. Claudia Herrera Tambeli / Nádía Cristina Fávoro Moreira, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/Unicamp em 27 de novembro de 2009.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 2014-1, entitled "Role of beta adrenoceptores in the nociception induced by formalin in rats' TMJ", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on November 27, 2009.

Campinas, 27 de novembro de 2009.

  
Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo  
Presidente

  
Fátima Alonso  
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP  
Caixa Postal 6109  
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359  
E-mail: [comisib@unicamp.br](mailto:comisib@unicamp.br)  
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>