



Faculdade de Odontologia de Piracicaba
UNICAMP

JOSIANE L. DE PAULA

Trabalho apresentado à disciplina de
Educação para Saúde, da Faculdade
de Odontologia de Piracicaba/UNICAMP,
para obtenção do título de Dentista.

TCC 088

PIRACICABA - 2002

Trabalho de Conclusão de Curso - TCC

Desenvolvimento de um modelo de incapacitação mastigatória através da administração de carragenina na ATM de ratos: Uma forma simples e objetiva de estudar a eficácia de agentes analgésicos e antiinflamatórios no tratamento das condições dolorosas da ATM.

Aluna: Josiane Laurindo de Paula

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Herrera Tambeli

Unidade/Instituição: Depto Ciências Fisiológicas - FOP / UNICAMP

1- Resumo:

O objetivo deste trabalho é desenvolver um modelo comportamental para estudar o potencial terapêutico de diferentes drogas analgésicas e antiinflamatórias no controle da dor inflamatória proveniente da ATM, no qual, a quantificação da resposta seja totalmente independente da subjetividade do observador. O modelo proposto é o da incapacitação mastigatória induzida pela administração do agente inflamatório, carragenina, na região da ATM de ratos. Após jejum de 12 h, NaCl 0,9 % (50 µl) ou diferentes concentrações (50, 100, 300 ou 600µg/50µl) de carragenina, será administrada na região da ATM de ratos e a função mastigatória será avaliada através da quantificação da ingestão de ração 3 e 6 horas após a injeção periarticular. Para verificar se o comprometimento da função mastigatória é revertido ou reduzido por drogas analgésicas ou antiinflamatórias, a morfina (4mg/kg) ou a dipirona (50mg/Kg) será administrada via intraperitoneal 1 hora após e a indometacina (5,0mg/Kg) 30 min antes da injeção periarticular de carragenina. Para verificar se o edema por si só é capaz de comprometer a função mastigatória, a mesma será avaliada como descrito anteriormente após a administração periarticular de Dextrano (200µg/50µl), um polissacarídeo que promove a formação de um edema não inflamatório. Para avaliação dos dados o teste t ou ANOVA acompanhada do teste de Dunnett ou de Dunn será aplicado quando apropriado ($p < 0,05$).

2 – Introdução:

As condições dolorosas temporomandibulares representam uma importante entidade clínica na Odontologia, estão associadas na maioria das vezes, a processos inflamatórios agudos ou crônicos, mas freqüentemente apresentam-se refratárias aos tratamentos

existentes (HASS et al., 1992). Na verdade, pouco se conhece a respeito de como a dor especialmente na região da ATM é desencadeada e menos ainda os mecanismos envolvidos. Inevitavelmente, isso tem conduzido a decisões terapêuticas incertas principalmente no campo farmacológico. A dificuldade no avanço desses conhecimentos se deve principalmente a falta de modelos experimentais apropriados para o estudo dessas condições, de preferência modelos que permitam testar vários animais simultaneamente, que discriminem diferentes tipos de drogas analgésicas e antiinflamatórias e que permitam, principalmente, a quantificação da resposta dolorosa independentemente da subjetividade do observador.

Atualmente as condições dolorosas da ATM tem sido estudadas experimentalmente após a administração de uma substância irritante na ATM de ratos principalmente através de métodos eletrofisiológicos de registro da atividade dos neurônios nociceptivos trigeminais (BROTON et al., 19889; SESSLE et al., 1993; IWATA et al., 1999) ou da atividade reflexa dos músculos da mastigação (TAMBELI et al., 1997, BAKKE et al., 1998; TSAI et al., 1999). A grande desvantagem dessas técnicas é o fato de consumirem muito tempo e de requererem a utilização de muitos animais, devido as dificuldades metodológicas. Ao contrário dos métodos eletrofisiológicos, o comportamental é o único que permite uma análise resultante da integração do sistema nervoso central como um todo, portanto, o mais apropriado para testar o efeito terapêutico de drogas analgésicas.

O teste da formalina da ATM é um modelo comportamental onde o agente irritante formalina é administrado na região da ATM de ratos e as respostas comportamentais nociceptivas caracterizadas pelo ato de coçar a região orofacial assimetricamente e levantar rapidamente a cabeça, são quantificadas (ROVERONI et al., 2000). Embora o modelo seja de relevância no estudo das condições dolorosas da ATM a sua confiabilidade depende de

um cuidadoso treinamento do observador. Vale a pena ressaltar que os modelos experimentais disponíveis no momento permitem o estudo da dor espontânea também chamada de “overt pain”, mas não o da dor inflamatória também conhecida por hiperalgesia (TATSUO et al., 1994). A dor inflamatória é resultante da síntese de prostaglandinas e é o tipo de dor mais frequentemente observada nas condições dolorosas da ATM.

Já é conhecido na literatura que a dor inflamatória promove um comprometimento da função normal da estrutura inflamada (WILLOUGHBY, 1988; TONUSSI & FERRERIA, 1992). O fato de pacientes portadores de condições dolorosas da ATM apresentarem ciclos mastigatórios com padrões totalmente irregulares têm sido descrito no meio científico há muitos anos atrás (ATKISON et al., 1961). O aumento concomitante da atividade eletromiográfica dos músculos elevadores e depressores da mandíbula desencadeado pela administração do agente inflamatório e estimulante de fibras C, óleo de mostarda, na ATM de ratos (YU, et al. 1995) sugere que a dor articular tende a imobilizar a mandíbula e a proteger a ATM nas condições de injúria ou inflamação na região temporomandibular (HANNAM & SESSLE, 1994). Nesse contexto, propusemo-nos a desenvolver um modelo comportamental de incapacitação mastigatória, na ATM de ratos, que permita estudar a dor inflamatória proveniente da ATM e o potencial terapêutico de diferentes drogas analgésicas e antiinflamatórias no controle desse tipo de dor independentemente da subjetividade do observador. Para o desenvolvimento do modelo proposto o agente inflamatório, carragenina, será administrado na ATM de ratos.

3 - Objetivos:

- 1 - Testar a hipótese de que a hiperalgesia inflamatória induzida pela administração de carragenina na ATM de ratos compromete a função mastigatória avaliada pelo grau de ingestão alimentar de ratos,
- 2 - No caso de comprovação da hipótese anterior, desenvolver um modelo de incapacitação mastigatória através da administração de diferentes concentrações de carragenina na ATM de ratos,
- 3 - Verificar se o comprometimento da função mastigatória pode ser revertido ou reduzido por drogas analgésicas e antiinflamatórias,
- 4 - Verificar se o edema por si só é capaz de comprometer a função mastigatória através da administração de dextrano na região da ATM de ratos,
- 5 - Avaliar morfometricamente o infiltrado inflamatório nas áreas periarticulares

4- Materiais e Métodos:

4.1 Animais :

Para a realização deste trabalho serão utilizados ratos machos da raça Wistar, pesando entre 250 e 400 gramas (g), provenientes do Biotério da FOP-UNICAMP. Os animais serão mantidos em gaiolas plásticas (05 por gaiola) contendo maravalha , em ambiente com controle de luminosidade (ciclos de claro/escuro de 12 horas) com alimentação e água, *ad libitum*. As sessões de testes serão realizadas durante a fase clara entre 11:00hs. e 17:00hs em sala silenciosa, com temperatura ambiente mantida a 25°C. Durante os testes os animais terão acesso livre à água. A experimentação animal seguirá as diretrizes propostas pelo Comitê para Pesquisa e Ética da Associação Internacional para Estudo da Dor em animais conscientes (ZIMMERMANN, 1983).

4.2 Teste Comportamental :

Para a realização do experimento serão utilizadas gaiolas metálicas individuais onde cada animal será inicialmente mantido em jejum de 12 horas. Após esse período o animal será removido da gaiola e levemente anestesiado por inalação de Halotano. Para administração de drogas na ATM esquerda será utilizada uma agulha calibre 30 conectada a uma seringa de microlitro Hamilton (50µl) por um tubo de polietileno P50. A borda póstero-inferior do arco zigomático será palpada e a agulha inserida na porção inferior da mesma, sendo avançada em direção anterior até contatar a região póstero-lateral do côndilo. Uma hora após a injeção periarticular será oferecido aos animais 50 gramas de ração Nuvital (grãos de ração sólida na forma cilíndrica pesando aproximadamente 10 g cada um) por um período de duas horas. Após esse período, a ração será retirada e pesada para a quantificação da ingestão alimentar nesse intervalo de tempo. Na sequência, a mesma quantidade de ração será novamente oferecida aos animais e retirada e pesada três horas após para uma nova quantificação da ingestão alimentar. A seguir, os animais serão novamente anestesiados por inalação de halotano e perfundidos com solução salina (NaCl 0,9 %). A ATM esquerda dos animais tratados com diferentes concentrações de carragenina será dissecada e o tecido periarticular será removido e fixado em formalina 10%. Após o preparo dos cortes histológicos (DRURY & WALLINGTON, 1967) os mesmos serão corados com hematoxilina e eosina. O processo inflamatório induzido pela carragenina será avaliado morfometricamente através do equipamento KS 400, versão 2,0, Zeiss em termos da intensidade de infiltrado inflamatório e a injeção periarticular de salina será utilizada como controle.

4.3 Soluções e drogas utilizadas:

Salina (NaCl 0,9 %), Carragenina (50, 100, 300 ou 600µg, Marine Colloids), Dextrano (200µg, Sigma), Sulfato de Morfina (4 mg/Kg, Merck), Dipirona (50mg/Kg, Hoechst), Indometacina (5mg/Kg, Merck). As drogas serão dissolvidas em salina, exceto a indometacina que será dissolvida em Tris (Tri-hidroximetil amino metano dissolvido em água destilada, pH 8,0).

4.4 Grupos experimentais :

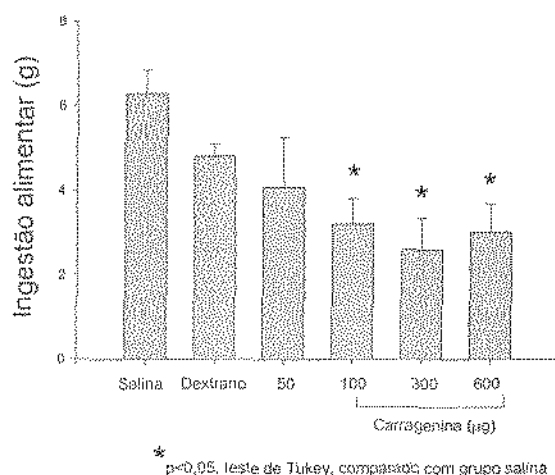
Para a realização do experimento os animais serão divididos aleatoriamente em grupos experimentais constituídos por 6 animais. Os diferentes tratamentos farmacológicos serão aplicados na região da ATM dos ratos num volume final de 50µl. Os animais serão submetidos a injeção periarticular (ATM esquerda) de 50 µl de salina (GRUPO I) ou diferentes concentrações de carragenina (50µg, GRUPO II; 100µg, GRUPO III; 300µg, GRUPO IV; 600µg, GRUPO V) ou ainda de dextrano (200µg, GRUPO VI). Após a administração periarticular, o animal será recolocado nas gaiolas individuais e a função mastigatória será avaliada pela quantidade de ração ingerida como descrito anteriormente. A seguir a morfina (4 mg/Kg, GRUPO VII), a dipirona (50mg/Kg, GRUPO VIII) ou a salina (GRUPO IX) será administrada intraperitonealmente num volume de 10ml/Kg, 1 hora após a administração periarticular de carragenina na mais baixa concentração capaz de promover uma ingestão alimentar estatisticamente diferente da observada nos animais que receberão salina na região da ATM. A indometacina (5,0mg/Kg, GRUPO X) ou seu veículo, Tris (GRUPO XI), será administrada pela mesma via, mas 30 min. antes da administração periarticular de carragenina.

4.5. Análise Estatística:

Os dados obtidos serão analisados empregando-se o teste t ou ANOVA acompanhada do teste de Dunnett ou de Dunn quando apropriado. Valores de $p < 0,05$ serão indicativos de significância estatística.

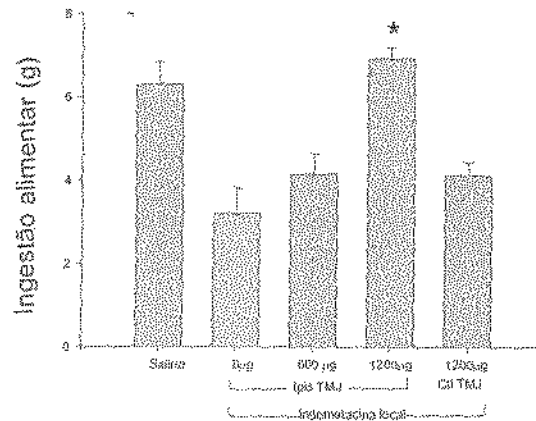
5- Resultados e Conclusão :

Efeito da administração de carragenina, dextrano ou salina na ATM de ratos.



Pelo gráfico acima observa-se que as substâncias Salina, Dextrano e Carragenina 50µg/25µl, quando injetadas na ATM não mostraram diferença estatística significativa entre si, no entanto quando comparadas às diferentes concentrações de carragenina variando entre 100 e 300µg/25µl mostraram diferença estatística como o esperado.

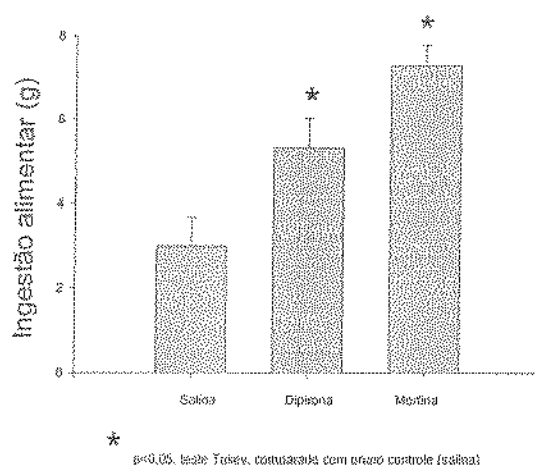
Efeito da co-administração de indometacina com carragenina 100 μ g na região da ATM



* $p < 0.05$ comparado com indometacina 0 μ g (grupo controle)

Quando utilizado o pré-tratamento com indometacina, apenas a concentração de 1200 μ g apresentou diferença significativa, quando comparado ao grupo controle, mostrando que a partir dessa concentração a indometacina pode interferir no processo inflamatório.

Efeito da administração sistêmica de dipirona e morfina na resposta nociceptiva induzida pela administração de carragenina na ATM de rato.



A administração de dipirona e morfina mostrou aumento significativo na ingestão alimentar se comparado ao grupo controle, mostrando que as substâncias analgésicas utilizadas foram eficazes no controle da dor inflamatória da ATM.

6 – Discussão:

A administração de carragenina na ATM em concentrações crescentes diminuiu significativamente ($p<0.05$, teste de Tukey) a ingestão alimentar se comparada a administração de solução salina. A quantificação da ingestão alimentar é realizada no período de duas horas, iniciando 1 hora após a administração da carragenina na ATM. A redução na ingestão alimentar foi significativa para a concentração de $100\mu\text{g}$ e se estendeu até a concentração de $300\mu\text{g}$.

A injeção intraperitoneal de Dipirona (500 mg/Kg) ou Morfina (4 mg/Kg) 1 hora após a injeção de carragenina aumentou significativamente a ingestão alimentar nos animais.

O pré-tratamento da ATM com indometacina (1200µg) também aumentou significativamente a ingestão alimentar indicando que esse método pode ser usado como método de quantificação da dor inflamatória na ATM.

7- Referências :

- ATKINSON, H.F., SHEPHERD, R.W. Temporomandibular joint disturbances and the associated masticatory patterns. **Australian Dental J.**, p. 219-222, 1961.
- BAKKE, M., HU, J.J., 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**, v. 75, p. 219-227, 1998.
- BROTON, J.G., HU, J.W., SEESLE, B.J. Convergent temporomandibular joint and cutaneous intraoral afferent inputs to trigeminal (V) subnucleus caudalis (medullary dorsal horn) neurones. **J. Neurophysiol.**, v. 59, n. 5, p. 1577-1589, 1988.
- DRURY, R. A. B. and Wallington, E.A. In: Carleton's Histological Technique, 4th ed., Oxford, 1967.
- HAAS, D.A. et al. Development of an orofacial model of acute inflammation in the rat. **Archs. Oral Biol.**, v. 37, n. 5, p. 417-422, 1992.
- HANNAM, A.G., SESSLE, B.J. Temporomandibular neurosensory and neuromuscular physiologu. In: ZARB, G. et al., ed. Temporomandibular joint and maticatory muscle disorders. Copenhagen: Munksgaard, 1994. pp. 67-100.

- IWATA, K. et al. Medullary dorsal horn neuronal activity in rats with persistent temporomandibular joint and perioral inflammation. **J. Neurophysiol.** v. 82, n. 3, p. 1244-1253, 1999.
- ROVERONI, R. C., PARADA, C. A., VEIGA, M.C.F.A, TAMBELI, C. H. The TMJ Formalin Test. Behavioral Responses and Peripheral Histaminergic Mechanisms Involved (abstract). **J. Dent. Res.** (Special Iss), v. 79, p. 321, 2000.
- SESSLE, B. J., HU, J. W., YU, X. M. Brainstem mechanisms of referred pain and hyperalgesia in the orofacial and temporomandibular region. In: New Trends in Referred Pain and Hyperalgesia. 1993 , pp. 59-71
- TAMBELI, C.H., TSAI, C.M., HU, J.W., SESSLE, B.J. Central Opioid Modulation of Mustard Oil – Evoked Jaw Muscle Activity (abstract). **J. Dent. Res.** (Special Iss), v. 76, p. 171, 1997.
- TATSUO, M., CARVALHO, W. M. , SILVA, C. V. , MIRANDA, A. E. G. , FERREIRA S. H. AND FRANCISCHI, J. N. Analgesic and antiinflammatory effects of dipyrone in rat adjuvant arthritis model. **Inflammation**, v. 18, p. 399-405, 1994.
- TSAI, C. M, CHIANG, C. Y, YU, X. M. AND SESSLE, B.J. Involvement of trigeminal subnucleus caudalis (medullary dorsal horn) in craniofacial nociceptive reflex activity. **Pain**, v. 81, p. 115-128, 1999.
- TONUSSI, C. R., FERREIRA, S. H. Rat knee-joint carragenin incapacitation test: an objective screen for central and peripheral analgesics. **Pain**, v. 48, p. 421-427, 1992.
- WILLOUGHBY, D.A. Inflammation. **Br. Med. Bull.**, v. 43, p. 247-255, 1987.
- YU, X.M.. et al. Effects of inflammatory irritant application to the rat temporomandibular joint on jaw and neck muscle activity. **Pain**, v. 60, p. 143-149, 1995.

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