



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Monografia de Final de Curso

Aluno(a): Lígia Ferrinho Pereira

Orientador(a): Prof.a. Dra. Maria Cecília Ferraz de Arruda Veiga

ANO DE CONCLUSÃO DO CURSO: 2007


Assinatura do(a) Orientador(a)

TCC 277

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
BIBLIOTECA

Lígia Ferrinho Pereira

**O EFEITO DO ESTRESSE AGUDO E CRÔNICO SOBRE A NOCICEPÇÃO NA
ATM DE RATOS**

Monografia apresentada ao curso de
Odontologia da Faculdade de
Odontologia de Piracicaba – Unicamp,
para obtenção do Diploma de Cirurgião-
Dentista

Orientadora: Prof.a. Dra. Maria
Cecília Ferraz de Arruda Veiga

Piracicaba
2006

Dedico este trabalho aos meus pais, Edvaldo e Iara, por tudo o que fizeram por mim, ao meu irmão Victor, por toda amizade e carinho e ao meu namorado Pissinato por todo cuidado e amor.

Dedico também às minhas amigas Carol, Flávia, Mirian, Fernanda, Luciana e Lillian, e aos meus amigos Willy e Leandro.

Agradeço a prof^a Cecília e ao Gustavo, por toda atenção e paciência dispensadas em minha orientação.

Sumário

Resumo.....	pág. 06
Introdução.....	pág. 07
Materiais e métodos	pág. 10
Resultados	pág. 15
Discussão	pág. 21
Conclusão	pág. 25
Bibliografia	pág. 26

Lista de tabelas

Tabela 1 - Avaliação dos níveis sanguíneos de ACTH e Corticosterona.....	pág. 15
--	---------

Lista de Figuras

Fig. 1: Efeitos do estresse na resposta nociceptiva induzida pelo teste da formalina na ATM.....	pág 16
Fig. 2: Efeito do estresse agudo na resposta comportamental nociceptiva.....	pág 17
Fig. 3: Efeito do estresse crônico na resposta comportamental nociceptiva...pág	18
Fig. 4: Efeito do estresse crônico por contenção no comportamento espontâneo de coçar.....	pág. 19
Fig. 5: Efeitos do estresse na corticosterona plasmática e níveis de ACTH	pág. 19
Fig. 6: Nível plasmático de ACTH após vários procedimentos de estresse .	pág. 20
Fig. 7: Soma das respostas nociceptivas da morfina.....	pág. 21

1. Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do estresse agudo e crônico sobre as respostas comportamentais nociceptivas induzidas pela injeção de formalina na articulação temporomandibular (ATM) de ratos (teste da formalina na ATM). Os animais foram inicialmente submetidos a uma sessão de estresse agudo por contenção (15 min; 30min ou 1h), ou expostos a um estresse crônico (40 dias – 1h/dia). Logo depois, os animais foram submetidos ao teste da formalina na ATM para avaliação da nocicepção. Foi avaliada a soma (em segundos) dos comportamentos nociceptivos de coçar a região orofacial e levantar rapidamente a cabeça durante 30 minutos. Foi avaliada também a relação entre os níveis sanguíneos de adrenocorticotropina (ACTH) e corticosterona, e as respostas nociceptivas registradas após os diversos protocolos de estresse. Os animais foram submetidos a uma sessão de estresse agudo por contenção (15 min; 30min e 1h), ou expostos ao estresse crônico (40 dias – 1h/dia). Logo depois, os animais foram mortos imediatamente para coleta de sangue e mensuração hormonal por radioimunoensaio; finalmente, foi avaliado o papel do sistema opióide nas alterações nociceptivas induzidas pelo estresse. Para isso, um agonista opióide (morfina 1-5 mg/Kg) foi administrado 30 min antes da realização dos ensaios de nocicepção. Os dados foram analisados utilizando-se o teste One-Way, (ANOVA). Comparações múltiplas foram realizadas aplicando-se o teste de Tukey. O programa utilizado foi o SAS. Este modelo contribui para a compreensão dos mecanismos neurais relacionados aos efeitos do estresse sobre a dor orofacial. A exposição a uma única sessão de estresse por contenção e ao estresse sub-crônico (3dias) não alterou as respostas comportamentais nociceptivas no teste da formalina na ATM. Os animais cronicamente estressados apresentaram hiperalgesia após a última sessão de contenção e diminuição no efeito analgésico da morfina. Houve um aumento significativo nos níveis de corticosterona plasmática após os vários protocolos de estresse, sendo menor após o estresse sub-cronico e o crônico. Pode-se concluir que todos os protocolos utilizados foram capazes de induzir estresse e que somente o estresse crônico alterou a

sensibilidade dolorosa induzindo hiperalgesia no teste da formalina na ATM como também reduzindo a sensibilidade aos efeitos analgésicos da morfina.

2. Introdução

Inúmeras investigações têm examinado a relação entre estresse psicológico e distúrbios temporomandibulares (DTM) (Greziak, 1991; Vanderas, 1994; Wexler & Steed, 1998). A disfunção muscular induzida por estresse pode secundariamente produzir alterações na articulação temporomandibular (ATM), resultando em mudanças na biomecânica articular, microtraumas às cápsulas articulares e meniscos e alterações na percepção de dor (Uhac *et al.*, 2003).

A analgesia induzida por estresse tem sido demonstrada tanto em humanos (Bandura *et al.*, 1988; Droste *et al.*, 1991) como em animais (Mogil *et al.*, 1996; Wiedenmayer & Barr, 2000; Lapo *et al.*, 2002). Em 1977, Chesher e Chan demonstraram que o choque nas patas (footshock) de camundongos produzia um efeito analgésico, o qual era antagonizado pela naloxona, um antagonista de receptor opióide. O footshock mostrou ser capaz de aumentar os níveis de peptídeos opióides endógenos (Akil *et al.*, 1976). Subseqüentemente, diversos estressores incluindo o footshock, natação, imobilização, isolamento e restrição têm sido utilizados para o estudo da analgesia induzida por estresse. Os efeitos analgésicos induzidos por estes estressores são comparados àqueles causados pela morfina em doses de 5-10 mg/Kg, porém a duração desses efeitos é relativamente menor, desaparecendo aproximadamente dentro de 30 minutos (Snow e Dewey, 1983; Giradot & Holloway, 1984). Muitas pesquisas evidenciam o envolvimento dos sistemas opióides na analgesia induzida por estresse. Primeiro, a exposição repetida ao estressor provocou o desenvolvimento de tolerância cruzada à analgesia induzida pela morfina (Urca *et al.*, 1981), e, segundo, vários estressores aumentaram a potência analgésica da morfina ou de agonistas seletivos de receptores opióides *mu*. (Belenki & Holaday, 1981; Calcagnetti *et al.*, 1992). Watkins *et al.*, 1992 mostraram que três sistemas de analgesia distintos (farmacologicamente e neuroanatomicamente) podem ser seqüencialmente

ativados pelo aumento no número de choques transcutâneos aplicados na cauda de ratos. A primeira analgesia (após dois choques) é mediada pelos receptores opióides *capa* da medula espinhal. A analgesia tardia (80-100 choques) é mediada por receptores *capa* e *delta* supraespinhais, enquanto a analgesia observada após 5-40 choques não é alterada pela naltrexona sistêmica e pela tolerância à morfina (Drugan *et al.*, 1981; Watkins *et al.*, 1992).

Estudos relatam que existem pelo menos duas formas clássicas de analgesia induzida por estresse, sendo essas caracterizadas em termos de sua mediação por mecanismos opióides ou não-opióides (Watkins *et al.*, 1982; Bodnar, 1986; Rochford & Stewart, 1987). Uma forma mista de analgesia induzida por estresse opióide-não opióide também é reconhecida (Lapo *et al.*, 2002). Isto significa que distintos mecanismos inibitórios da dor podem ser ativados, dependendo das propriedades do estressor. Os fatores que podem ter um papel nessas diferenças são a intensidade do estressor (Terman *et al.*, 1986), sua duração (Mogil *et al.*, 1996), a capacidade de controle sobre o agente estressor (Maier & Keith, 1987) e outros fatores tais como a linhagem e raça dos animais (Urca *et al.*, 1985; Gamaro *et al.*, 1998). Terman *et al.*, 1984 propuseram que os mecanismos analgésicos mediados pelo sistema opióide são ativados quando o estressor é breve e fraco, enquanto a analgesia não opióide é recrutada quando o estímulo estressor se torna mais intenso e prolongado. Além disso, Kirchgessner *et al.*, 1982 constataram que existe um modelo de inibição colateral, no qual ambos os sistemas de analgesia induzida por estresse (opióide e não-opióide) promovem inibição recíproca.

Embora os estudos anteriores tenham demonstrado os clássicos efeitos analgésicos do estresse, muitas pesquisas relatam que determinadas condições experimentais (estresse agudo e crônico) podem provocar hiperalgesia ao invés de analgesia (Vidal & Jacob, 1982; Satoh *et al.*, 1992; Quintero *et al.*, 2000). Por exemplo, uma breve exposição a um estresse emocional, como a exposição a novos ambientes, produz uma hiperalgesia imediata e transitória (Vidal & Jacob, 1982), enquanto o estresse prolongado por contenção (40 dias) induz hiperalgesia que persiste por até 28 dias após a suspensão do estresse crônico (Torres *et al.*,

2003). Os mecanismos relacionados à hiperalgesia de longa duração ainda não estão esclarecidos. É possível que esse aumento de percepção aos estímulos dolorosos estejam relacionados à alterações no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, nos receptores opióides ou em qualquer outro sistema responsável pela resposta de estresse.

Nos estudos citados anteriormente, os testes utilizados para medir a analgesia consistia na aplicação de estímulos nocivos físicos à tecidos superficiais, como por exemplo o tail-flick, no qual é determinado o tempo de latência para mover a cauda após a aplicação do estímulo. Não existem modelos experimentais em animais sobre o efeito do estresse sobre condições dolorosas profundas, as quais possuem características diferentes em relação à dores provenientes de tecidos cutâneos (Sessle & Hu, 1990).

Considerando a relação existente entre estresse e crises de dor facial (Suvinen *et al.*, 1997) e também a capacidade do estresse em alterar a percepção e resposta à dor, estudos sobre os mecanismos das alterações nociceptivas induzidas pelo estresse nas dores profundas são relevantes para a pesquisa sobre a etiologia de desordens dolorosas crônicas.

Sabe-se que a injeção de formalina, bem como outros ensaios de nocicepção, tais como o tail-flick e hot-plate são considerados estímulos estressantes. No caso do teste da formalina na ATM, o estresse dos procedimentos (como manipulação e injeção por exemplo) foi controlado no trabalho em que o teste foi padronizado, utilizando-se grupos controle com salina (Roveroni *et al.*, 2001).

Em nosso projeto, a formalina foi usada como estímulo nociceptivo, e a contenção como estímulo estressor. Ou seja, todos os grupos foram submetidos à injeção de formalina para avaliar a nocicepção, porém apenas os grupos experimentais (estressados) serão submetidos à contenção, sendo que os grupos controle não serão submetidos às sessões de estresse.

3. Materiais e Métodos

3.1. Animais

Foram utilizados ratos machos Wistar, com 2-4 meses, pesando em média 350 gramas, provenientes do Cemib-Unicamp. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura, umidade e claridade (ciclos claro/escuro de 12h), sendo oferecida alimentação e água, "ad libitum".

Os procedimentos experimentais seguiram as diretrizes propostas pelo comitê para Pesquisa e Ética da Associação Internacional para o estudo da dor em animais conscientes (Zimmermann, 1983). Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal, Instituto de Biologia - UNICAMP (protocolo 705-1).

3.2. Delineamento Experimental

3.2.1. Protocolos de estresse

Os animais foram estressados por contenção (1h/dia), 5 dias por semana, durante 40 dias no modelo crônico (Torres *et al.*, 2003). No modelo agudo, os animais foram submetidos a uma única sessão de estresse por contenção (15 min; 30min ou 1h). A contenção será feita através da colocação do animal em um tubo plástico (25 X 7 cm²) ajustável. Um orifício de 1cm em uma das extremidades do tubo permitia ao animal respirar durante o experimento. Os grupos controle não foram submetidos às sessões de estresse e foram manipulados pelo mesmo período dos grupos experimentais. Os procedimentos de imobilização foram realizados entre 10:00 e 12:00 h em ambiente silencioso. Imediatamente após a última sessão de imobilização, os animais foram submetidos ao teste da formalina na ATM.

3.2.2. Análise da nociceção (teste da formalina na ATM)

As sessões de testes foram realizadas durante a fase clara entre 07:00 e 12:00h em uma sala silenciosa, com temperatura ambiente mantida à $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ (Rosland, 1991).

Para a análise comportamental, foi utilizada uma câmara de observação (30cm x 30cm x 30 cm) com base e laterais espelhadas e frente de vidro. Cada animal foi inicialmente colocado e mantido na câmara por 10 minutos para habituar-se ao local de experimentação e minimizar o estresse do ambiente.

Após esse período, o animal foi removido da câmara e levemente anestesiado por inalação de halotano. Para administração de formalina na região da ATM esquerda foi utilizada uma agulha de calibre 30 conectada a uma seringa Hamilton (50 μl) por um tubo de polietileno P₅₀.

Logo após a injeção, o animal foi recolocado na câmara de observação e as respostas comportamentais nociceptivas caracterizadas pelos atos de coçar a região orofacial (segundos) e levantar rapidamente a cabeça (número de vezes) foram quantificadas por 30 minutos (10 blocos de 3 minutos) com o auxílio de um cronômetro e um contador de células, respectivamente (Roveroni *et al.*, 2001).

Os comportamentos nociceptivos foram analisados conjuntamente pela soma do período de tempo que os animais apresentaram o comportamento de coçar a região orofacial (CO), com o número de vezes que os animais levantaram rapidamente a cabeça (LC) ao longo do período de observação. Para a soma dos comportamentos, foi determinado que cada ato de levantar rapidamente a cabeça (LC) corresponde a 1 segundo (Roveroni *et al.*, 2001).

As análises comportamentais foram realizadas por um pesquisador que não tinha conhecimento dos tratamentos que foram instituídos (estudo cego).

Como procedimento de rotina, o sítio de aplicação da formalina foi confirmado *pós-mortem* através do indicador de edema, caracterizado pelo extravasamento plasmático do corante Azul de Evans (1%), administrado endovenosamente (0,4 ml), sob anestesia com alfa-cloralose (50 mg/Kg) e de uretano (1 g/Kg), 10 minutos antes do animal ser sacrificado e perfundido com salina. Como o corante

Azul de Evans se liga às proteínas plasmáticas (Haas, *et al.*, 1992), o local da aplicação da injeção poderá ser identificado visualmente.

3.2.3. Determinação da concentração do ACTH e da corticosterona plasmática por radioimunoensaio

Após a realização dos protocolos de estresse, os ratos foram mortos por decapitação. O sangue foi coletado em tubos plásticos heparinizados e centrifugados imediatamente à 2500 rpm à 4^oC por 10 min. O plasma foi então transferido para novos tubos e armazenados à - 30^oC para posterior ensaio hormonal. As concentrações plasmáticas de ACTH foram determinadas por técnica de radioimunoensaio (RIA). O kit de RIA foi fornecido pela Diagnostic Systems Inc. Para a análise da corticosterona plasmática, seguimos o protocolo do anticorpo de corticosterona da SIGMA (Anti-Corticosterone -- C-8784). Alíquotas de 20 µl do plasma foram transferidas para 980 µl do tampão Tris (Tris-HCl 0,05M (SIGMA); NaCl 0,1M (SIGMA); azida sódica 0,1% (MERCK) - pH 8,0) e incubadas em banho de água a 75^oC durante 1 hora, para o deslocamento da corticosterona da globulina plasmática. Após a incubação as amostras foram resfriadas a temperatura ambiente. Em tubos de polipropileno foram adicionados 100 µl do plasma diluído no tampão Tris. A seguir foram adicionados 500 µl do anticorpo para corticosterona diluído no tampão de diluição (Tris-HCl 0,05M (SIGMA); NaCl 0,1M (SIGMA); soroalbumina bovina (BSA) 0,1% (SIGMA), azida sódica 0,1% (MERCK) - pH 8,0). Os tubos foram incubados à temperatura ambiente durante 30 minutos e logo em seguida foram adicionados 100 µl de [1,2-³H(N)] – Corticosterone diluída no tampão de diluição (2,5 µl [3H]-Corticosterone : 1 ml de tampão de diluição) para a obtenção de uma contagem de aproximadamente 20.000 cpm por tubo de reação. A seguir, as amostras foram incubadas em banho de água por 1 hora, a 37^oC.

Os tubos foram resfriados a 4^oC durante 15 minutos e após esse período foram adicionados 200 µl da suspensão de carvão ativado (Tris-HCl 0,05M (SIGMA); NaCl 0,1M (SIGMA); BSA 0,1% (SIGMA), azida sódica 0,1% (MERCK); carvão

ativado 0,5% (SIGMA); Dextran T70 0,5% (SIGMA) – pH 8,0). Os tubos foram incubados em gelo por 10 minutos, seguida de centrifugação a 2.000 x g por 15 minutos, a 4°C. Após a centrifugação, 600 µl do sobrenadante foram transferidos para os frascos de contagem da cintilação contendo 5 ml do líquido de cintilação (Aqueous Counting Scintillant® – Amersham Pharmacia Biotech) e a radiação (cpm) da [3H] – Corticosterone foi determinada no espectrofotômetro de cintilação líquida (Beckman).

Foi feita uma curva padrão de corticosterona nas concentrações de 62,5; 125; 250; 500 e 1000 pg/100µl. As concentrações da corticosterona presentes nas amostras foram calculadas interpolando-se as leituras obtidas das amostras (valores de y) na curva padrão e expressos em µg / 100ml de plasma.

3.2.4. Avaliação dos níveis sanguíneos de ACTH e Corticosterona (Tabela 1).

Os animais foram inicialmente submetidos a uma sessão de estresse agudo por contenção (15 min; 30min ou 1h), ou expostos a um estresse crônico (40 dias – 1h/dia). Logo depois, os animais foram mortos imediatamente para coleta de sangue e mensuração hormonal por radioimunoensaio.

Tabela 1 - Avaliação dos níveis sanguíneos de ACTH e Corticosterona (Grupo A).

AValiação	TIPO DE ESTRESSE	SUB GRUPOS
Radioimunoensaio	estresse agudo 15 min	I _A
Radioimunoensaio	estresse agudo 30 min	II _A
Radioimunoensaio	estresse agudo 1 hora	III _A
Radioimunoensaio	estresse crônico (40 dias)	IV _A
Radioimunoensaio	não estressado (controle)	V _A

3.2.5. Administração de morfina.

Para os casos nos quais o estresse tenha alterado significativamente as respostas nociceptivas induzidas pelo teste da formalina na ATM, foram realizados grupos adicionais para avaliar o papel do sistema opióide nas alterações induzidas pelo estresse.

Embora vários estudos tenham demonstrado os clássicos efeitos analgésicos do estresse (Mogil *et al.*, 1996; Wiedenmayer & Barr, 2000; Lapo *et al.*, 2003), outros relatam que determinadas condições experimentais pelo estresse podem provocar hiperalgesia ao invés de analgesia (Quintero *et al.*, 2000; Torres *et al.*, 2003).

Dados preliminares obtidos no estudo piloto sugerem que os animais cronicamente estressados (40 dias) apresentam um aumento nas respostas nociceptivas, indicando uma possível hiperalgesia, e no caso de se confirmarem esses dados preliminares, a próxima etapa do experimento foi a de verificar o envolvimento do sistema opióide, avaliando-se a sensibilidade de um agonista opióide (morfina) nos animais controles e estressados.

Os animais foram submetidos ao estresse crônico conforme descrito acima. Após a última sessão de imobilização (os grupos controle não foram submetidos às sessões de estresse), os animais receberam uma injeção intraperitoneal de morfina 1,0 mg/Kg (Torres *et al.*, 2003), 5,0 mg/Kg ou salina (n= 6/grupo) 30 min antes da administração de formalina 1,5% na ATM. O sulfato de morfina foi dissolvido em 0,9% de salina e administrado i.p. em um volume de 1,0 ml/Kg.

3.3. Soluções Utilizadas:

- **Formalina** 1,5%: consiste na diluição de formaldeído a 37% em NaCl 0,9%.
- **Morfina [Sulfato de morfina: Dimorf (10mg/ml)]** – na dose de 1 mg/Kg e 5 mg/Kg.
- **Alfa-CLoralose** 50 mg/Kg (SIGMA).

- **Uretano** 1 g/Kg (SIGMA).
- **Halotano** – CRISTÁLIA.
- **Azul de Evans** (SIGMA) na concentração de 1%.

3.4. Análise estatística:

A avaliação das respostas comportamentais nociceptivas foi feita utilizando-se o teste-t e o teste One-Way, análise de variância (ANOVA). Comparações múltiplas foram realizadas aplicando-se o teste de TUKEY. Para todos os testes o nível de significância foi estabelecido em $p < 0.05$. Os dados foram apresentados pela média +/- Desvio Padrão. O programa utilizado para a realização dos cálculos estatísticos foi o SAS (version 8.2 for windows) by Institute Inc., Cary, NC, USA-licensed to Universidade Estadual de Campinas

4. Resultados

4.1. Efeitos do estresse na resposta nociceptiva induzida pelo teste da formalina na ATM:

Os resultados são mostrados na figura 1. Imediatamente após a última sessão de contenção (1h/40 dias), os animais cronicamente estressados estavam hiperalgésicos. O aumento da resposta comportamental nociceptiva foi estatisticamente significativa ($p < 0.05$, teste *t*) quando o grupo controle foi comparado com o grupo estressado. Não houve diferença estatística entre os grupos controle (não estressados) e os grupos de contenção aguda (15 min, 30 min ou 60 min) e o grupo sub-cronico (Fig. 1).

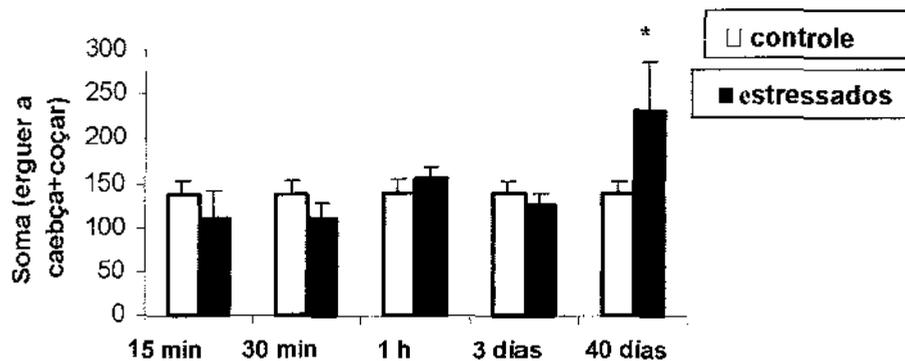


Fig. 1: Soma do comportamento de coçar e levantar a cabeça dos animais tratados com formalina (50 μ l, 1.5%) e previamente submetidos ao procedimento de estresse ($n=6/grupo$) ou deixados sem perturbação em suas gaiolas ($n=6/grupo$). Cada coluna representa uma media. Barra de erro indica o desvio padrão. Os dados foram analisados utilizando o teste t student. Não foi encontrada diferença significativa nas respostas comportamentais nociceptivas entre os grupos controle e agudamente estressados (15 min, $p=0.1571$), (30 min, $p=0.0754$) e (1 h, $p=0.1247$). Também não houve diferença estatística entre os grupos sub-crônicos e seus respectivos grupos controle ($p=0.2149$). (*) Indica diferença significativa entre o crônico e seu respectivo grupo controle ($p<0.05$).

4.2. Efeito do estresse agudo na resposta comportamental nociceptiva:

A exposição a uma única sessão de contenção por 1h não afeta as respostas nociceptivas provocadas pela injeção de formalina 1,5% na ATM de ratos (fig. 2). Não houve diferença estatística ($p=0.125$) entre o grupo controle (não estressado) e o grupo estressado.

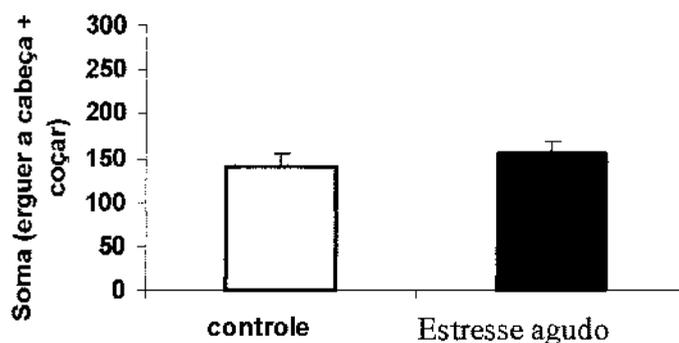


Fig 2.: Soma do comportamento de levantar a cabeça e coçar a região orofacial observado em animais tratados com formalina (50 μ l, 1.5%) previamente submetidos a 1h de contenção ou deixados sem perturbação em sua gaiola (n=6). Cada coluna representa uma média. A barra de erro indica o desvio padrão. Não foi encontrada diferença significativa entre as respostas nociceptivas entre o grupo controle e o estressado ($p=0.125$; teste t)

4.3. Efeito do estresse crônico na resposta comportamental nociceptiva

Os resultados são mostrados na figura 3. Imediatamente após a última sessão de contenção (1h/40 dias), os animais cronicamente estressados estavam hiperalgesicos. Um aumento estatisticamente significativo nas respostas comportamentais nociceptivas foi observado nos grupos estressados quando comparados com o grupo controle ($p<0.05$, teste T).

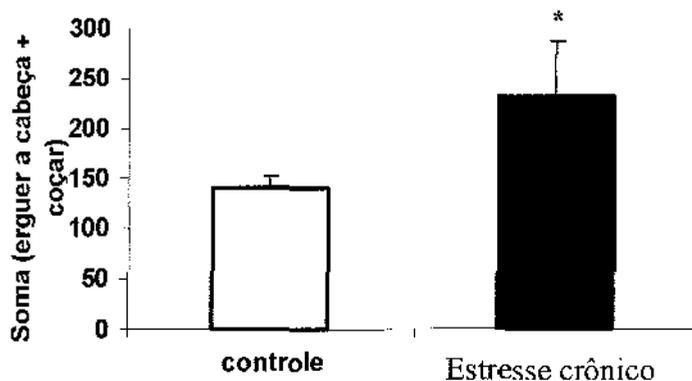


Fig 3.: Soma do comportamento de levantar a cabeça e coçar a região orofacial observado em animais tratados com formalina (50 μ l, 1.5%) previamente submetidos ao estresse crônico ou deixados sem perturbação em sua gaiola (n=6). As colunas representam uma média. A barra de erro indica o desvio padrão. (*) Diferença significativa entre o grupo controle e o grupo estressado ($p < 0.05$, teste *t*).

4.4. Efeito do estresse crônico por contenção no comportamento espontâneo de coçar

Nós também avaliamos o coçar espontâneo para excluir a possibilidade de um comportamento motor aumentado induzido pelo processo de estresse crônico. Os ratos cronicamente estressados exibiram um comportamento similar ao do grupo controle (não estressado) quando solução salina foi administrada na ATM ($p = 0.7488$, teste Mann-Whitnet, Fig.4).

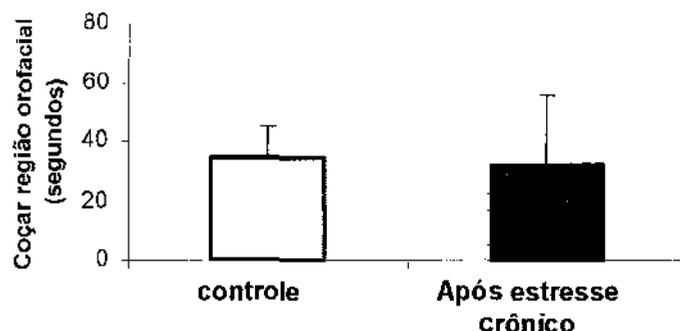


Fig 4.: Duração do comportamento de coçar a região orofacial em ratos submetidos previamente ao estresse crônico ($n=6$) ou deixados sem ser perturbados em suas gaiolas ($n=6$). As colunas representam uma média. A barra de erro indica o desvio padrão. Não houve diferença estatística entre os grupos estressados e controle ($p=0.7488$, teste Mann-Whitney).

4.5. Efeitos do estresse na corticosterona plasmática e níveis de ACTH:

Esse experimento foi realizado a fim de determinar a eficácia do estresse por contenção nas modificações hormonais. Houve significativo aumento nos níveis de corticosterona plasmática após os vários protocolos de estresse utilizados (Fig. 1; teste Mann-Whitney, $p<0.05$). Esse aumento foi menor após o estresse sub-crônico e o crônico que após o estresse agudo por 30 min (Fig.1; Kruskal-Wallis, $p<0.05$).

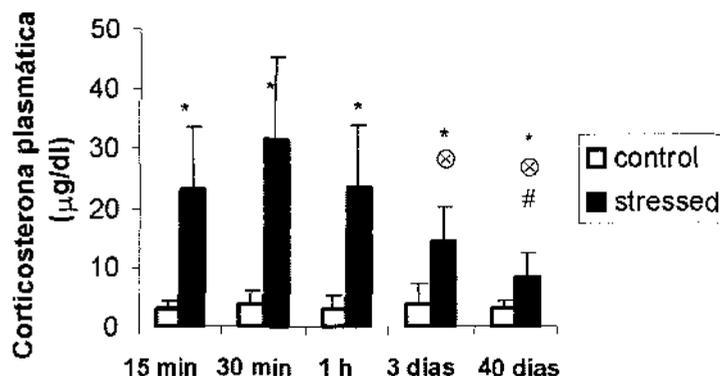


Fig. 5.: Nível plasmático de corticosterona após os vários protocolos de estresse. Cada ponto do gráfico representa o desvio padrão de 8 ratos. Os dados foram

analisados utilizando os testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis. (*) $p < 0.05$ quando comparado com o respectivo grupo controle. (⊗) $p < 0.05$ comparando com o grupo de estresse agudo 30 min. (#) $p < 0.05$ comparando com estresse agudo 15 min.

O aumento plasmático dos níveis de ACTH foram estatisticamente significantes para todos os grupos agudos testados (Fig. 6; teste Mann-Whitney, $p < 0.05$). Não houve diferença estatística entre os grupos crônicos e sub-crônicos quando comparados com seus respectivos grupos controle (Fig. 2; teste Mann-Whitney, $p < 0.05$).

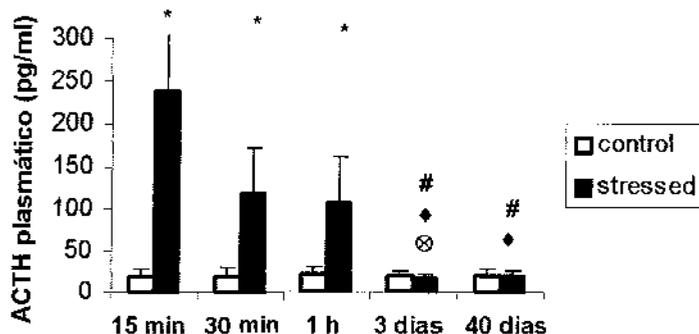


Fig.6: Nível plasmático de ACTH após vários procedimentos de estresse. Cada ponto do gráfico representa \pm SEM de 8 ratos. As barras verticais indicam o desvio padrão. Os dados foram analisados utilizando os testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis. (*) $p < 0.05$ quando comparado com o respectivo grupo controle. (#) $p < 0.05$ quando comparado com estresse agudo 15 min. (♦) $p < 0.05$ quando comparado com estresse agudo 30 min. (⊗) $p < 0.05$ quando comparado com estresse agudo 60 min.

4.6. Efeitos da morfina na nocicepção em ratos controle e repetidamente estressados

Os resultados referentes ao efeito analgésico da morfina são mostrados na figura 7. ANOVA revelou diferença entre os grupos [$F(1,30)=53.54$; $p < 0.0001$], drogas

[$F(2,30)=35.94$; $p<0.0001$] e uma interação significativa entre estresse e morfina [$F(2,30)=10.88$; $p=0.003$]. Teste Posthoc (Tukey) revelou que a administração de morfina produz uma redução significativa de respostas comportamentais nociceptivas no grupo controle (não estressados). Morfina 1mg/Kg reduz as respostas nociceptivas 30 min após a administração ($p<0.05$), e morfina 5mg/Kg também teve esse efeito ($p<0.05$). No grupo estressado, a morfina teve efeito somente na dose de 5mg/Kg ($p<0.05$) quando comparado com o grupo salina.



Fig. 7: Soma das respostas nociceptivas da morfina (1 ou 5 mg/Kg i.p.) ou salina após 40 dias de estresse crônico por contenção. Barras brancas: grupos controle ($n=6/grupo$); barras pretas: grupo estressado ($n=6/grupo$). Cada coluna representa uma média. Barra de erro indica o desvio padrão. (*) Diferença significativa entre salina vs. morfina ($p<0.05$, ANOVA + Tukey). (#) Diferença significativa entre controle vs. ratos estressados ($p<0.05$, ANOVA + Tukey).

5. Discussão

Tem sido demonstrado que uma variedade de estímulos estressores podem induzir analgesia, um fenômeno muitas vezes relatado como algesia induzida pelo estresse (S/A) (Amir e Amit, 1978; Watkins et al., 1982). No presente estudo, uma única exposição (15min, 30min, 1h) ao estresse por contenção não reduziu as respostas comportamentais nociceptivas desencadeadas pela injeção de formalina (1,5%) na ATM de ratos.

A habilidade desse procedimento em induzir estresse pode ser confirmada pelo altos níveis de ACTH e de corticosterona apresentados pelos animais submetidos à contenção quando comparados aos controles (não estressados). Um dos efeitos da exposição ao estresse agudo é a redução das respostas reflexas que incluem a retirada da cauda ou da pata, ou o ato de lambar em ratos (Gamaro et al., 1998). Entretanto, muitas destas respostas envolvem um determinado nível de controle cérebro espinal, podendo ser consideradas propositais, independentes do processamento central do sinal nociceptivo, que resulta na percepção da dor (Mauderli et al., 2000; Vierck et al., 2002). Segundo King et al., 2003, o estresse agudo diminui as respostas reflexas geradas por impulsos nociceptivos, entretanto, pode aumentar as respostas a estímulos dolorosos, como os estímulos térmicos nociceptivos, sugerindo que o estresse induz hiporeflexia, que pode coexistir com a hiperalgesia induzida pelo estresse.

De acordo com esses achados, podemos considerar que uma única sessão de estresse não é capaz de induzir analgesia em ratos submetidos ao teste da formalina na ATM, envolvendo respostas comportamentais nociceptivas que possuem um nível organizacional diferente daquele relacionado aos reflexos inatos, por exemplo, no teste de sensibilidade a estímulos térmicos, tail flick, a resposta pode ser modulada diretamente ao nível espinal (King et al., 2003).

Entretanto, a ausência de analgesia induzida pelo estresse agudo no presente modelo pode também estar relacionada ao diferente sitio de aplicação da formalina. A discrepância na susceptibilidade a modulação pelo estresse entre diferentes modelos de nocicepção tem revelado que o tipo de estressor, sua intensidade, duração, bem como o tipo de modelo utilizado para avaliar a nocicepção afeta não somente a potência do efeito analgésico ou hiperalgesico, como também os mecanismos neurais responsáveis por esses efeitos. A literatura sugere que a ativação desses circuito regulatorios por um tipo particular de estressor é crucialmente dependente dos atributos desse agente estressor.

Da mesma forma, o modelo de estresse sub crônico (3 dias) não interfere na nocicepção induzida pela injeção de formalina na ATM. Quintero et al., 2000, observaram que o estresse sub crônico por natação induziu um aumento

estatisticamente significativa na nocicepção térmica e química (teste da formalina na pata). Novamente acreditamos que pelo diferente sitio de aplicação da formalina, que em nosso caso foi na ATM, ou seja, em tecido profundo, e pelo modelo de estresse utilizado (por contenção) não obtivemos alterações significativas nas respostas comportamentais nociceptivas. Segundo Iwata et al., 1999, a inflamação na ATM induz alterações mais profundas no sistema nervoso central que a inflamação de tecidos periorais.

Em contraste com o estresse agudo e sub crônico, nós observamos que os animais submetidos ao estresse crônico (40 dias) apresentaram um aumento nas respostas comportamentais nociceptivas quando comparadas com as do grupo controle (não estressado). Em concordância com os nossos resultados, estudos prévios também demonstraram que o estresse crônico pode induzir hiperalgesia ao invés de hiperalgesia (Lewis et al., 1980; Quintero et al., 2003; Torres et al., 2003).

Alguns estudos tem indicado que a corticosterona e o ACTH podem reduzir a nocicepção (MacLennan et al., 1982; Kelly et al., 1993).

Os animais submetidos ao estresse agudo (15 min, 30 min e 60 min), sub crônico (3 dias) e crônico (40 dias) apresentaram um significativo aumento dos níveis de corticosterona plasmática, já o nível de ACTH não diferiu estatisticamente entre os grupos de estresse crônico e sub crônico quando comparados com seus respectivos controles. Como já era esperado, o aumento na corticosterona plasmática foi menos no estresse crônico e sub crônico quando comparado com o agudo. Considerando que o nível de corticosterona pode ser utilizado como indicador de estresse, podemos concluir que os vários protocolos de estresse por contenção utilizados foram capazes de induzir estresse.

Desta forma, pelos resultados encontrados, podemos sugerir que a hiperalgesia induzida pelo estresse no teste da formalina na ATM não esta relacionada aos baixos níveis de corticosterona e ACTH observados em ratos estressados cronicamente, uma vez que os animais submetidos ao estresse sub crônico também apresentaram baixos níveis de corticosterona e ACTH, e no entanto as respostas comportamentais nociceptivas não foram alteradas. Nos parece então

que a hiperalgesia induzida pelo estresse crônico pode resultar de efeitos a longo prazo desencadeados pela persistência do estresse.

O aumento nas respostas comportamentais nociceptivas induzidas pelo estresse crônico por contenção pode ter importantes aplicações em relação a outros estudos que também relatam efeitos hiperalgesicos após exposição a uma variedade de estressores (Quintero et al., 2000; Torres et al., 2003 a, b). No entanto, o presente estudo pode ser de relevância por utilizar um modelo experimental de nocicepção envolvendo injúria de tecidos profundos, como a ATM. São muitos os relatos encontrados na literatura relacionando estresse e dor orofacial crônica, como os de Grzesiak, 1991; Vanderas, 1994, dentre outros, entretanto, pouco se conhece sobre a fisiopatologia e sobre os mecanismos neurais relacionados aos efeitos dos estímulos estressores sobre a sensibilidade dolorosa.

O desenvolvimento de modelos experimentais como este do trabalho, poderá ser de grande valia na elucidação de mecanismos envolvidos nessas condições dolorosas, como também para testar a eficácia de novas drogas analgésicas.

Nossos resultados sugerem que o aumento dos comportamentos de levantar a cabeça rapidamente e cocar a região orofacial no teste da formalina na ATM é um efeito da hiperalgesia induzida pelo estresse crônico. O mecanismo pelo qual a repetição do estímulo estressor pode induzir hiperalgesia não está claro, mais de um mecanismo pode estar envolvido. Quintero et al., 2000, demonstraram que o aumento da nocicepção térmica e química observada após estresse sub crônico, por natação, pode ser mediada por mudanças na atividade do sistema serotoninérgico central. Torres et al., 2003 b, sugerem que a repetição de estresse por contenção pode induzir uma resposta adaptativa em ratos cronicamente estressados, a qual poderia levar a dessensibilização do receptor adenosina. Torres et al., 2003 a, também mostraram que ratos cronicamente estressados apresentam diminuição do efeito da morfina na nocicepção.

No nosso experimento testamos a sensibilidade a morfina (1 e 5 mg/Kg) em ratos controle e estressados cronicamente, submetidos ao teste da formalina na ATM. Os resultados demonstraram que os animais submetidos repetidamente ao

estresse por contenção apresentam uma diminuição no efeito da morfina na nocicepção quando comparados aos respectivos controles. Nos animais estressados foi necessário um aumento da dose (5 mg/Kg) para evidenciar o clássico efeito analgésico da morfina.

A tolerância na resposta à morfina observada no presente estudo corrobora com a hipótese sugerida por outros autores de que o estresse crônico por contenção pode modificar a atividade do sistema opioide (Drolet et al., 2001).

A menor sensibilidade ao efeito analgésico da morfina observada em ratos cronicamente estressados pode ser devida a alterações do número ou da afinidade dos receptores opioides centrais ou periféricos, ou ainda ser decorrente de alterações em outros neurotransmissores ou hormônios capazes de interagir em esses receptores. Como a morfina exerce seu efeito antinociceptivo primário atuando no subtipo do receptor mu-opioide (Omiya et al., 2000), a menor sensibilidade à morfina observada nos animais submetidos ao teste da formalina na ATM após estresse crônico pode estar relacionada a alterações no nível desses receptores. Estudos futuros poderão avaliar a atividade de receptores opioides. Nesse modelo, nos sugerimos que a influência de opioides endógenos liberados durante o estresse crônico poderia levar ao desenvolvimento de tolerância ao efeito nociceptivo da morfina.

A continuidade deste estudo na tentativa de elucidar possíveis mecanismos envolvidos na hiperalgesia induzida por estresse pode ser de relevância para o estudo da etiologia de processos dolorosos envolvendo dor crônica, como a disfunção temporomandibular.

6. Conclusões

1. O estresse agudo e sub crônico por contenção não altera a nocicepção no teste da formalina na ATM.
2. Todos os protocolos de estresse por contenção utilizados induziram um aumento da corticosterona plasmática, confirmando a habilidade desses procedimentos em induzir estresse.
3. O estresse crônico por contenção induz hiperalgesia no teste de formalina na ATM e reduz a sensibilidade aos efeitos analgésicos da morfina.

7. Bibliografia

Akil H.; Madden J.; Patrick R.L.; Barchas J.D., 1976. Stress-induced increase in endogenous opiate peptides: concurrent analgesia and its partial reversal by naloxone. In H.W. Kosterlitz (Ed.), *Opiate and Endogenous Opiate Peptides*, Elsevier, Amsterdam, 63-70.

Amir, S, Amit, Z. Endogenous opioid ligands may mediate stress-induced changes in the affective properties of pain related behavior in rats. *Life Sci.* 1978;23:1143-51.

Bandura A.; O'Leary A.; Taylor C.B.; Gauthier J.; Gossard D., 1988. Perceived self-efficacy and pain control: opioid and nonopioid mechanisms. *J Pers Soc Psychol* 55, 479-488.

Belenky G.L.; Holaday J.W., 1981. Repeated electroconvulsive shock (ECS) and morphine tolerance: demonstration of cross-sensitivity in the rat. *Life Sciences* 29, 553-563.

Bodnar R.J., 1986. Neuropharmacological and neuroendocrine substrates of stress-induced analgesia. *Ann. NY. Acad. Sci.* 467, 345-360.

Calcagnetti DJ, Holtzman SG. Factors affecting restraint stress-induced potentiation of morphine analgesia. *Brain Res.* 1990 Dec 24;537(1-2):157-62.

Chesher G.B.; Chan B., 1977. Footshock induced analgesia in mice: its reversal by naloxone and cross tolerance with morphine. *Life Sciences* 21, 1569-1574.

Drolet, G, Dumont, EC, Gosselin, I, Kinkead, R, Laforest, S, Trottier, JF. Role of endogenous opioid system in the regulation of the stress response. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2001;25:729-41.

Droste C.; Greenleeve M.W.; Schrek M.; Roskamm H., 1991. Experimental pain thresholds and plasma beta-endorphin levels during exercise. *Med Sci Sports Exerc* 23, 334-342.

Drugan R.C.; Grau J.W.; Mainer S.F.; Maddan IVJ.; Barchas J.D., 1981. Cross tolerance between morphine and the long-term analgesic reaction to inescapable shock. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 14, 677-682.

Gamaro, GD, Xavier, MH, Denardin, JD, Pilger, JA, Ely, DR, Ferreira, MB, Dalmaz C. The effects of acute and repeated restraint stress on the nociceptive response in rats. *Physiol Behav.* 1998;63:693-7.

Giradot M.N.; Holloway F.A., 1984. Intermittent cold water stress-analgesia in rats: cross-tolerance to morphine. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 20, 631-633.

Greziak R.C., 1991. Psychologic consideration in temporomandibular dysfunction. *Dental Clinics of North America* 35, 339.

Haas, DA, Nakanishi, O, MacMillan, RE, Jordan, RC, Hu, JW. Development of an orofacial modelo facute inflammation intherat. *Arch Oral Biol.* 1992;37:417-422.

Iwata, K, Tashiro, A, Tsuboi, Y, Imai, T, Sumino, R, Morimoto, T, Dubner, R, Ren, K. Medullary dorsal horn neuronal activity in rats with persistent temporomandibular joint and perioral inflammation. *J Neurophysiol.* 1999;82:1244-1253.

Kelly DD, Silverman AJ, Glusman M, Bodnar RJ. Characterization of pituitary mediation of stress-induced antinociception in rats. *Physiol Behav.* 1993 Apr;53(4):769-75.

King, CD, Devine, DP, Vierck, CJ, Rodgers, J, Yeziarski, RP. Differential effects of stress on escape and reflex responses to nociceptive thermal stimuli in the rat. *Brain Res.* 2003;987:214-22.

Kirchgessner A.L.; Bonar R.J.; Patersnak J.W., 1982. Naloxazone and pain-inhibitory systems: evidence for a collateral inhibition model. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 17, 1175-1179.

Lapo I.B.; Konarzewski M.; Sadowski B., 2003. Effect of cold acclimation and

repeated swimming on opioid and nonopioid swim stress-induced analgesia in selectively bred mice. *Physiol Behav* 78, 345-350.

Lewis, JW, Cannon, JT, Liebeskind, JC. Opioid and nonopioid mechanisms of stress analgesia. *Science*. 1980;208:623-5.

MacLennan AJ, Drugan RC, Hyson RL, Maier SF, Madden J 4th, Barchas JD. Dissociation of long-term analgesia and the shuttle box escape deficit caused by inescapable shock. *J Comp Physiol Psychol*. 1982 Dec;96(6):904-12.

Maier S.F.; Keith L.R., 1987. Shock signals and development of stress-induced analgesia. *J Exp Psychol (Anim Behav)* 13, 226-238.

Mauderli, AP, Acosta-Rua, A, Vierck, CJ. An operant assay of thermal pain in conscious, unrestrained rats. *J Neurosci Methods*. 2000;97:19-29.

Mogil J.S.; Sternberg W.F.; Balain H.; Liebeskind J.C.; Sadowski B., 1996. Opioid and nonopioid swim stress-induced analgesia: a parametric analysis in mice. *Physiol Behav* 59, 123-132.

Omiya, Y, Goto, K, Ishige, A, Komatsu, Y. Changes in analgesia-producing mechanism of repeated cold stress loading in mice. *Pharmacol Biochem Behav*. 2000;65:261-6.

Quintero L.; Moreno M.; Ávila C.; Arcaya J.; Maixner W.; Suarez-Roca H., 2000. Long-lasting delayed hyperalgesia after subchronic swim stress. *Pharmacol. Biochem. Behav*. 67, 449-458.

Rochford J.; Stewart J., 1987. Activation and expression of endogenous pain control mechanisms in rats given repeated nociceptive tests under the influence of naloxone. *Behav. Neurosci*. 101, 87-103.

Rosland, J. H.. The formalin test in mice: the influence of ambient temperature. *Pain*, v.45, p.211-216, 1991.

Roveroni RC, Parada CA, Cecília M, Veiga FA, Tambeli CH. Development of a behavioral model of TMJ pain in rats: the TMJ formalin test. *Pain*. 2001 Nov; 94(2): 185-91.

Satoh, M, Kuraishi, Y, Kawamura, M. Effects of intrathecal antibodies to substance P, calcitonin gene-related peptide and galanin on repeated cold stress-induced hyperalgesia: comparison with carrageenan-induced hyperalgesia. *Pain*. 1992;49:273-8.

Sessle, BJ, Hu, JW. Mechanisms of pain arising from articular tissues. *Can J Physiol Pharmacol*. 1990;69:617-626.

Snow A.E.; Dewey W.L., 1983. A comparison of antinociception induced by footshock and morphine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 227, 42-50.

Suvinen T.I.; Hanes K.R.; Gerscham J.A.; Reade P.C., 1997. Psychophysical subtypes of temporomandibular disorders. *Journal of Orofacial Pain* 11, 200.

Terman G.W.; Shavit Y.; Lewis J.W.; Cannon J.T.; Liebeskind J.C., 1984. Intrinsic mechanisms of pain inhibition: activation by stress. *Science* 226, 1270-277.

Terman, GW, Morgan, MJ, Liebeskind, JC. Opioid and non-opioid stress analgesia from cold water swim: importance of stress severity. *Brain Res*. 1986;372:167-71.

Torres I.L.S.; Cucco S.N.S.; Bassani M.; Duarte M.S.; Silveira P.P.; Vasconcellos A.P.; Tabajara A.S.; Dantas G.; Fontella F.U.; Dalmaz C.; Ferreira M.B.C., 2003. Long-lasting delayed hyperalgesia after chronic restraint stress in rats- effect of morphine administration. *Neuroscience Research* 45, 277-283.

Uhac I.; Kovac Z.; Valentic-Peruzovic M.; Juretic M.; Moro L.J., 2003. The influence of war stress on the prevalence of signs and symptoms of temporomandibular disorders. *Journal of Oral Rehabilitation* 30, 211-217.

Urca G.; Yitzhaky J.; Frenk H., 1981. Different opioid systems may participate in post-electroconvulsive shock (ECS) analgesia and catalepsy. *Brain Research* 219,

385-396.

Urca G.; Segev S.; Same Y., 1985. Footshock-induced analgesia: its opiate nature depends on the strain. *Brain Research* 329, 109-116.

Vanderas A.P., 1994. Relationship between craniomandibular dysfunction and malocclusion in white children with and without unpleasant life events. *Journal of Oral Rehabilitation* 21, 177.

Vidal C.; Jacob J.J.C., 1982. Stress hyperalgesia in rats: an experimental animal model of anxiogenic hyperalgesia in humans. *Life Sciences* 31, 1241-1244.

Watkins, LR, Cobelli, DA, Faris, P, Aceto, MD, Mayer, DJ. Opiate vs non-opiate footshock-induced analgesia (FSIA): the body region shocked is a critical factor. *Brain Res.* 1982;242:299-308.

Watkins L.R.; Wiertelak E.P.; Maier S.F., 1992. Kappa opiate receptors mediate tail-shock induced antinociception at spinal levels. *Brain Research* 582, 1-9.

Wexler G.B.; Steed P.A., 1998. Psychological factors and temporomandibular outcomes. *Cranio: The Journal of Craniomandibular Practice* 16, 72.

Wiedenmayer C.P.; Barr G.A., 2000. Mu opioid receptors in the ventrolateral periaqueductal gray mediate stress-induced analgesia. *Behav Neurosci* 114, 125-136.

Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 1983;16:109-110.