



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Monografia de Final de Curso

Aluno(a): Andressa Tamara Rocha de Queiroz

Orientador(a): Fernanda Klein Marcondes

Ano de Conclusão do Curso: 2005



Assinatura do(a) Orientador(a)

ANDRESSA TAMARA ROCHA DE QUEIROZ

**EFEITOS DA DOR OROFACIAL E DO DIAZEPAM SOBRE O
COMPORTAMENTO DE RATOS SUBMETIDOS AO TESTE DO
LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO.**

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

Orientadora: Profa. Fernanda Klein Marcondes

Piracicaba – SP
2005

Dedico este trabalho a minha família, meus amigos e a todos que ajudaram na realização deste projeto.

AGRADECIMENTOS

A Profa. Fernanda Klein Marcondes, pela elaboração e apoio neste projeto, tão qual pela sua habilidade em relação a orientação desse trabalho.

SUMÁRIO

	p.
I. Atividades de pesquisa	04
1. Resumo e objetivos do projeto	04
2. Material e métodos	05
2.1 Animais	05
2.2 Delineamento experimental	05
2.3 Tratamentos experimentais	07
2.4 Teste do labirinto em Cruz Elevado (LCE)	08
2.5 Soluções utilizadas	09
2.6 Análise estatística	10
3. Resultados e discussão	10
4. Conclusão	25
II. Referências bibliográficas	26

II. ATIVIDADES DE PESQUISA

1. Resumo e objetivos do projeto

O tratamento odontológico geralmente induz um quadro de ansiedade e apreensão que pode estar relacionado à dor trans ou pós-operatória na região orofacial, à lembrança de alguma experiência dolorosa em tratamentos prévios, ou à expectativa da dor. Modelos animais permitem uma diminuição do número variáveis experimentais, tais como efeitos psicológicos e sociais e, portanto, são muito úteis em pesquisas na área de Fisiologia. Em um estudo prévio observamos que a dor induzida pela administração de formalina no lábio induziu respostas comportamentais que indicam aumento no nível de ansiedade em ratos de laboratório (DOMINGOS *et al.*, 2000a). A avaliação do nível de ansiedade foi realizada por meio do teste do labirinto em cruz elevado (PELLOW *et al.* 1985; DOMINGOS *et al.*, 2000a; CRUZ *et al.*, 1994).

Neste teste comportamental, se um tratamento aumenta a preferência do animal pelos braços abertos, é tido como ansiolítico. A confirmação desta interpretação é feita farmacologicamente com a utilização de um fármaco com ação ansiolítica. O diazepam é o agente ansiolítico padrão utilizado nos testes comportamentais para avaliação da ansiedade. Sua ação se deve a sua ligação a sítios alostéricos do receptor GABA_A, o que potencializa a resposta deste receptor ao agonista endógeno GABA (RODGERS & JOHNSON, 1998).

A fim de confirmar se a ansiedade é causada somente pelo estímulo nociceptivo obtido com a injeção de formalina ou se existem fatores coadjuvantes relacionados ao processo, utilizaremos como agente analgésico o paracetamol (200 mg/Kg, i.p.), 30 minutos antes da administração da formalina (CLAVELOU, 1989). A menor dose de paracetamol efetiva em inibir respostas nociceptivas, de acordo com Clavelou (1989), será por nós utilizada para evitarmos a ocorrência de efeitos sedativos, os quais poderiam alterar a resposta comportamental do animal no LCE.

Além disso, iremos comparar o estímulo nociceptivo no lábio com o estímulo de uma região não orofacial utilizando, assim, o dorso do animal.

Neste contexto, o objetivo do presente estudo é realizar a validação dos dados preliminares indicativos de que a dor orofacial aumenta o nível de ansiedade em ratos (DOMINGOS *et al.*, 2000a). Para isto nossa proposta foi 1) comparar o efeito da dor orofacial com aquele da dor somática, através da injeção de formalina no dorso, 2) avaliar

o efeito do diazepam sobre a resposta comportamental ao LCE, induzida pela administração de formalina na região orofacial (validação farmacológica) e 3) confirmar se o efeito ansiogênico observado se deve realmente à dor, por meio do pré-tratamento do animal com paracetamol como analgésico, antes da administração da formalina.

2. Material e métodos

2.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos, de padrão sanitário SPF ("specific pathogen free"), fornecidos pelo Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica (CEMIB) - UNICAMP, com 2 meses de idade. Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas da FOP, em número de 5 animais por gaiola contendo maravalha, em sala climatizada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e com ciclo de claro/escuro de 12 h, com alimentação e água à vontade (ROSLAND, 1991). Os procedimentos experimentais foram realizados no período entre 7:30 e 11:30h. Todos os procedimentos experimentais foram analisados e aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, protocolo número 392-1.

2.2. Delineamento Experimental

Como, para a administração de uma substância no lábio do animal é necessário que o mesmo seja anestesiado, inicialmente comparamos o efeito do tratamento Controle (somente manipulação para a limpeza das gaiolas) com aquele da anestesia superficial com halotano (Controle anestesia).

Para avaliação do efeito da dor sobre o nível de ansiedade, animais tratados com injeção de veículo (solução estéril de cloreto de sódio 0,9% = Salina lábio) ou formalina (1,0% = Formalina lábio) no lábio foram submetidos ao teste do LCE. O grupo salina lábio é necessário para avaliar se a resposta no LCE se deve ao estímulo algésico ou à introdução de um volume no tecido subcutâneo. Além disso, para a comparação entre os efeitos da dor orofacial e da dor somática alguns animais receberão veículo ou o agente algésico no dorso (Salina dorso e Formalina dorso). Para a validação farmacológica e avaliação da participação da neurotransmissão gabaérgica nas respostas comportamentais, alguns animais serão tratados com diazepam i.p. ou veículo (Formalina lábio + DZP e Formalina dorso + DZP). E para confirmação de que o efeito se

deve à dor, alguns animais receberão, antes da administração de formalina, no lábio ou no dorso, uma injeção i.p. do analgésico paracetamol (Paracetamol i.p. + formalina lábio, Paracetamol i.p. + formalina dorso).

Os animais dos grupos salina e formalina dorso, receberam uma injeção s.c. de 50 µL de solução salina ou formalina 1,0%, respectivamente na parte superior do dorso.

No grupo Formalina lábio + diazepam, imediatamente após a injeção s.c. de salina ou formalina, os animais receberam uma administração intraperitoneal de diazepam (1 mg/Kg), e foram submetidos ao teste do LCE, 30 min depois.

No grupo Formalina lábio + Paracetamol (200 mg/Kg v.o.), este agente foi administrado por via oral, através de um aplicador introduzido na cavidade bucal do animal, 30 min antes da injeção de formalina. E, 30 min depois da administração de formalina, foram submetidos ao teste do LCE. Esclarecemos que a administração foi realizada via oral devido à dificuldade na dissolução do fármaco em solvente que não provocasse irritação peritoneal (solução de água + álcool etílico) ou apresentasse algum efeito tóxico (metanol + água). Como foi utilizado um aplicador, asseguramos a deglutição do volume aplicado, e portanto da dose administrada a cada animal.

Nos grupos realizados para avaliação do efeito da administração do diazepam e do paracetamol, na ausência do estímulo nociceptivo, os animais foram submetidos ao teste do LCE, 30 min depois terem recebido uma administração de diazepam (1 mg/Kg i.p.) ou de paracetamol (200 mg/Kg v.o.).

Antes de todos os procedimentos acima descritos, os animais eram submetidos à anestesia superficial por inalação de halotano.

Os grupos experimentais propostos estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Grupos experimentais para avaliação do efeito da dor orofacial sobre o nível de ansiedade em ratos.

	Grupos	Tratamento
1	Controle	Somente limpeza das gaiolas
2	Controle anestesia	Anestesia com halotano
3	Salina lábio	Anestesia + salina s.c. lábio
4	Formalina lábio	Anestesia + formalina s.c. lábio
5	Salina dorso	Anestesia + salina s.c. dorso
6	Formalina dorso	Anestesia + formalina s.c. no dorso
7	Formalina lábio + diazepam	Anestesia + formalina s.c. lábio + DZP i.p.
8	Formalina dorso + diazepam	Anestesia + formalina s.c. dorso + DZP i.p.
9	Paracetamol + formalina lábio	Anestesia + paracetamol i.p. + formalina s.c. lábio
10	Paracetamol + formalina dorso	Anestesia + paracetamol i.p. + formalina s.c. dorso

2.3. Tratamentos experimentais

No dia do experimento, entre 7:30 e 10:30h, os animais foram levados do biotério para o laboratório de pesquisa. Após 30 min de permanência no laboratório para eliminação do estresse causado pelo transporte do animal, os animais foram individualmente colocados na câmara anestésica, onde foram submetidos à anestesia superficial por inalação de vapor de halotano, por aproximadamente 40s. Imediatamente após a verificação de que o animal encontrava-se anestesiado, este recebeu uma injeção s.c. de 50 μ L de solução salina ou formalina 1,0% no lábio superior e lateralmente ao nariz (CLAVELOU, 1995), de acordo com o grupo experimental (Tab. 1). Para tanto foi utilizada agulha calibre 30 acoplada a uma microseringa Hamilton (50 μ L) por intermédio de uma cânula de polietileno PE50.

Imediatamente após a injeção s.c. de formalina na região orofacial (FERNÁNDEZ-GUASTI & PICAZO, 1990), os animais do grupo Formalina Lábio + Diazepam receberam administração intraperitoneal de diazepam (1,0 mg/Kg) ou veículo. Após a administração das drogas de acordo com cada grupo experimental, os animais foram transportados até a sala de comportamento (adjacente ao laboratório de

pesquisa), e 30 min após a injeção, foram submetidos ao teste do LCE para avaliação do nível de ansiedade.

Nos grupos realizados para avaliação do efeito da administração do diazepam e do paracetamol, na ausência do estímulo nociceptivo, os animais foram submetidos ao teste do LCE, 30 min depois terem recebido uma administração de diazepam (1 mg/Kg i.p.) ou de paracetamol (200 mg/Kg v.o.). O teste comportamental foi realizado entre 8:30 e 11:30 h.

Já nos grupos Paracetamol + Formalina Lábio e Paracetamol + Formalina Dorso, o paracetamol foi administrado por via oral, 30 min antes da injeção de formalina. E, 30 min depois da administração de formalina, foram submetidos ao teste do LCE. Já este teste comportamental foi realizado entre 9:00 e 12:00h.

2.4. Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

Cada animal foi submetido individualmente, somente uma vez a este teste comportamental, e seu comportamento foi filmado durante 5 minutos (PELLOW *et al.*, 1985). Antes de ser colocado no labirinto, cada animal foi identificado por meio de um número afixado em frente à câmera durante alguns segundos. Isto foi feito para que no experimento filmado não haja a identificação do tratamento recebido pelo animal (experimento cego). O animal foi colocado no centro do labirinto, de frente para um dos braços fechados. (PELLOW *et al.*, 1985; NICIPORCIUKAS, 2000; SETEM, 2000; MARCONDES *et al.*, 2001).

A análise do comportamento de cada animal foi feita por dois pesquisadores treinados e calibrados, e para a análise dos dados foi considerada a média das avaliações feitas por ambos. Foram registrados os tempos de exploração dos braços abertos e fechados e o número de entradas nos braços abertos e fechados. Uma entrada foi considerada quando o animal colocou as quatro patas em um braço aberto ou fechado (PELLOW *et al.*, 1985; CRUZ *et al.*, 1994).

Os resultados foram convertidos em:

1) Porcentagem de tempo de exploração dos braços abertos ($100 \times \text{tempo (s)} / \text{tempo total de observação}$)

2) Porcentagem de entradas feitas nos braços abertos (100 x nº de entradas nos braços abertos/ nº total de entradas)

3) Nº de entradas feitas nos braços fechados

A porcentagem de tempo nos braços abertos é considerada um índice de medo e ansiedade, enquanto o número de entradas nos braços fechados corresponde a um índice de atividade locomotora (PELLOW *et al.*, 1985; CRUZ *et al.*, 1994). A porcentagem de entradas nos braços abertos está relacionada tanto à atividade locomotora quanto à ansiedade (CRUZ *et al.*, 1994).

Os seguintes parâmetros propostos por CRUZ *et al.* (1994) e RODGERS *et al.* (1999), também foram avaliados (NIPORCIUKAS, 2000; SETEM, 2000):

1) Número de vezes em que o animal chega ao final do braço aberto.

2) Avaliação de risco - comportamento de conflito do animal.

O número de vezes em que o animal chega ao final do braço aberto é inversamente proporcional ao seu nível de ansiedade. A avaliação de risco está diretamente relacionada com o nível de ansiedade e é medido pelo número de vezes que o animal se dirige ao centro do labirinto, mas não entra em outro braço.

2.5. Soluções utilizadas

Os animais foram superficialmente anestesiados com halotano (CRISTÁLIA) por 40 segundos. Para indução da dor a substância utilizada foi a formalina 1,0% (CLAVELOU, *et al* 1995; ROVERONI, *et al.*, 2001), preparada a partir da diluição de Formaldeído® 37% (SIGMA-F-1635) em solução esterilizada de cloreto de sódio 0,9%. O agente ansiolítico utilizado foi o diazepam (ROCHE® 1,0 mg/Kg) diluído em propileno glicol 40% (FERNÁNDEZ-GUASTI & PICAZO, 1990). E, o analgésico utilizado foi o paracetamol 200 mg/Kg v.o. (CLAVELOU, *et al* 1989), sendo este fármaco utilizado por via oral nos animais.

2.6. Análise estatística

A comparação entre os grupos Controle e Controle Anestesia foi feita por meio do teste t de Student para amostras não pareadas. Os dados foram analisados por meio de análise de variância, seguida do teste de Tukey. O nível de significância foi de 5 %.

3. Resultados e Discussão

Inicialmente apresentaremos os resultados referentes à avaliação do efeito da anestesia sobre o comportamento de ratos submetidos ao teste do LCE.

Para que pudéssemos injetar uma substância que causa dor, no lábio do animal, tornou-se necessária a utilização de anestesia superficial. Os animais foram então anestesiados por inalação de vapor de halotano. A observação da figura 1A mostra que não houve diferença significativa na porcentagem de tempo nos braços abertos entre os grupos controle e controle anestesia ($p > 0.05$). A porcentagem de tempo gasta nos braços abertos está inversamente relacionada ao nível de ansiedade do animal, e portanto este resultado confirmou que a anestesia superficial com halotano não alterou o nível de ansiedade dos animais.

Na figura 1B está ilustrado o gráfico com a porcentagem de entradas realizadas nos braços abertos em cada grupo avaliado. A porcentagem de entradas realizadas nos braços abertos é um índice tanto do nível de ansiedade quanto da atividade locomotora do animal (CRUZ et al., 1994). Como não houve diferença estatística entre os grupos analisados, os dados indicam que além da ansiedade também a atividade locomotora não foi alterada pela anestesia utilizada.

Na figura 1C foi ilustrado o número de entradas realizadas nos braços fechados, o que é um índice da atividade locomotora do animal (CRUZ et al., 1994). Este dado confirmou que a anestesia com halotano não alterou a atividade locomotora dos animais, tendo em vista que não houve diferença no nº de entradas nos braços fechados entre os grupos controle e controle anestesiado (Fig. 1C, $p > 0,05$).

Além destes parâmetros, também foram analisadas a avaliação de risco e o número de idas ao fim dos braços abertos.

Na figura 2A está ilustrada a avaliação de risco que consiste no comportamento exploratório do animal no qual ele expressa o conflito entre a curiosidade e o medo (CRUZ et al. 1994; WEISS et al., 1998 e RODGERS et al., 1999). A avaliação de risco está diretamente relacionada com o nível de ansiedade e é medida pelo número de vezes que

o animal se dirige ao centro do labirinto, mas não entra em outro braço. A observação da figura 2A mostra que não houve diferença na avaliação de risco entre o grupo controle e o grupo controle anestesiado ($p>0,05$).

Na figura 2B está ilustrado o número de idas ao fim dos braços abertos. O número de vezes que o animal chega ao final do braço aberto é inversamente proporcional ao seu nível de ansiedade. Podemos observar através deste gráfico que o anestésico não alterou este parâmetro, e portanto confirma-se que não teve efeito sobre o nível de ansiedade dos animais ($p>0,05$).

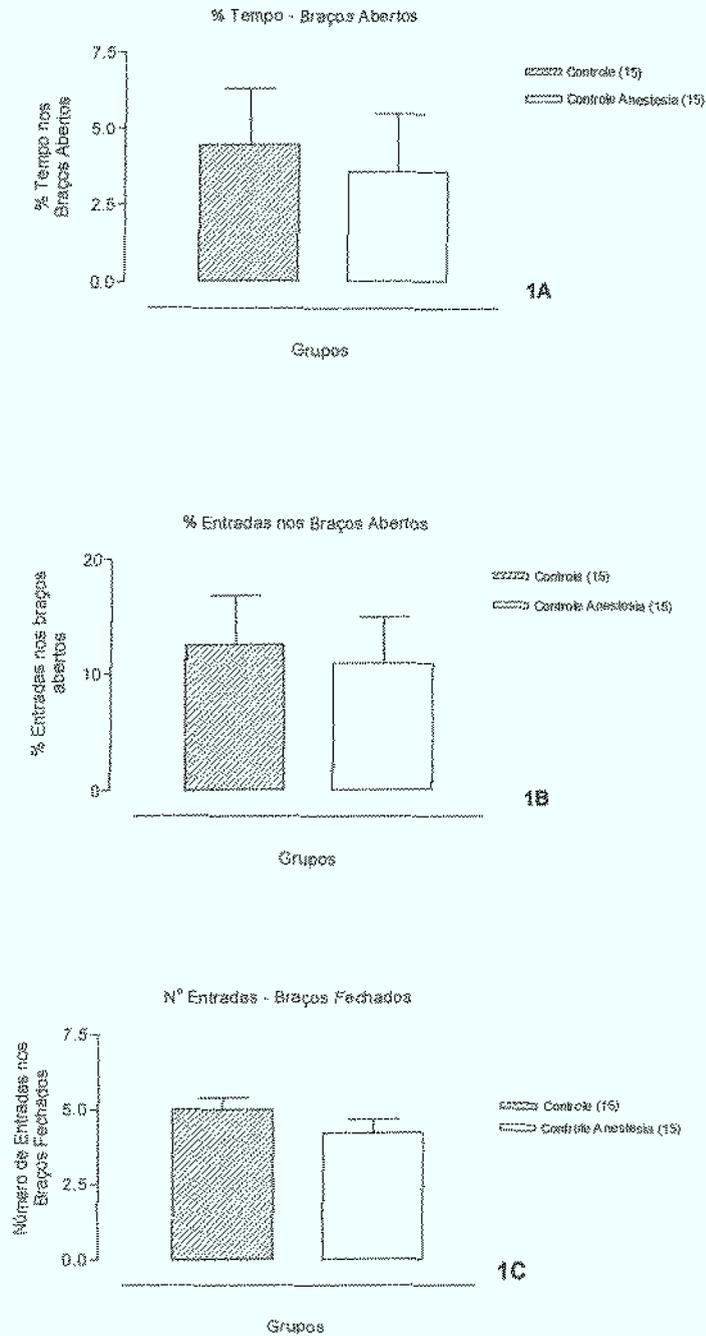


Figura 1. Porcentagem de tempo de exploração dos braços abertos (1A), porcentagem de entradas nos braços abertos (1B) e número de entradas realizadas nos braços fechados (1C) de ratos submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado 30 min após anestesia superficial com halotano (controle anestesiado). O nº de experimentos/grupo está indicado entre parênteses.

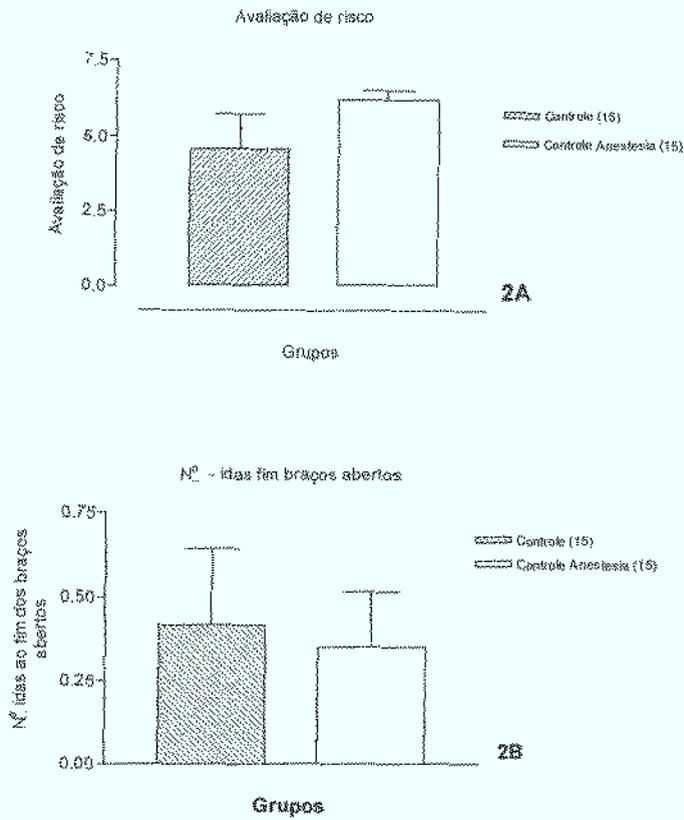


Figura 2. Avaliação de risco (2A) e idas ao fim dos braços abertos (2B) de ratos submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado 30 min após manipulação (controle), anestesia superficial com halotano (controle anestesiado). O nº de experimentos/grupo está indicado entre parênteses.

Num contexto geral, a dor é subjetiva e está ligada ao “sistema nociceptivo”. Segundo Schaible et al. (2004) a dor pode se classificar em diferentes tipos tais como dor neuropática, dor nociceptiva fisiológica e dor nociceptiva patofisiológica.

A dor neuropática é causada pela injúria ou doença dos neurônios periféricos ou do sistema nervoso central, possuindo características elétricas como a neuralgia do trigêmio (Schaible et al., 2004). Entretanto, esse tipo de dor não foi avaliada no nosso estudo, apenas a dor nociceptiva fisiológica e a dor nociceptiva patofisiológica foram estudadas. Na primeira fase da resposta dolorosa à formalina, pudemos avaliar a dor nociceptiva fisiológica a qual foi provocada por um estímulo aplicado ao tecido normal, que no caso estava relacionado ao momento da injeção subcutânea de formalina no lábio ou dorso. No instante em que a dor é originada, o organismo gera um reflexo que tenta proteger o tecido de ser demasiado. Esse reflexo é característico da dor nociceptiva fisiológica (Schaible et al, 2004).

Já a dor nociceptiva patofisiológica é decorrente de um tecido inflamado ou injuriado (Schaible et al., 2004). No nosso estudo, essa dor foi causada pela inflamação gerada pela injeção subcutânea de formalina no lábio ou dorso na segunda fase de ação da droga. A sensibilização durante a inflamação é realizada pela ação dos mediadores inflamatórios nos nociceptores. Numerosos mediadores inflamatórios tais como prostaglandinas, histaminas e bradicininas são produzidos gerando os sinais clássicos de inflamação: tumor, calor, rubor e dor.

A ansiedade é uma forma de inibição comportamental que ocorre em resposta a eventos ambientais que representem novidade e/ou sejam punitivos (RANG et al., 1995). Em seres humanos, é muito difícil determinar se a ansiedade é gerada como consequência do paciente sentir dor durante o tratamento odontológico ou simplesmente pela expectativa da sensação dolorosa ou desagradável, embora provavelmente ambos os fatores sejam importantes. Contudo, devido a uma gama de fatores externos (sociais, econômicos, comportamentais), torna-se extremamente difícil quantificar a ansiedade, bem como afirmar que ela seja a responsável por aumentar a nocicepção ou vice-versa. Por essa razão, são muito úteis as pesquisas comportamentais com modelos animais para a melhor compreensão dos mecanismos subjacentes à depressão e ansiedade, e na avaliação dos efeitos ansiolíticos e ansiogênicos dos novos fármacos (GREEN & HODGES, 1991).

Neste projeto de pesquisa avaliamos a dor nociceptiva patofisiológica e inflamatória originada pela administração subcutânea de formalina no lábio relacionando-a com a ansiedade gerada pela dor no animal. Foram também realizados grupos de injeção subcutânea no dorso: um com a administração de solução salina e outro com uma solução de formalina. Logo, comparamos o efeito da dor somática representada pela injeção de solução de formalina no dorso do animal com o efeito da dor orofacial representada pela injeção de formalina no lábio.

Apresentaremos os resultados referentes à avaliação do efeito da injeção de formalina no lábio e no dorso sobre as respostas comportamentais ao teste do LCE. Por meio da sensação tátil dada pelas vibrissas, o animal percebe o ambiente ao seu redor. Quando está próximo a paredes verticais, o contato das vibrissas com as mesmas permite uma melhor percepção do ambiente e isto conseqüentemente faz com que o animal se sinta mais seguro. Ao contrário, ambientes abertos geram medo e ansiedade. Assim sendo, o rato ou camundongo apresentam uma tendência a permanecer próximos a paredes verticais, o que é conhecido como tigmotaxia, e explica a preferência dos animais pelos braços fechados no LCE (TREIT *et al.*, 1993). Se um tratamento aumenta a preferência do animal pelos braços abertos, é tido como ansiolítico. Ao contrário, se um tratamento diminui a preferência do animal pelos braços abertos, é tido como ansiogênico.

Considerando a ausência de efeito do método anestésico por nós utilizado sobre a resposta comportamental de ratos submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado (LCE), para as demais comparações serão utilizadas as respostas representadas pelo grupo Controle anestesia.

A seguir serão apresentados os dados referentes aos efeitos da administração subcutânea de solução veículo (salina) ou agente algésico (formalina) no lábio e no dorso dos animais sobre as respostas comportamentais ao teste do LCE. Estes dados serão apresentados nas figuras 3 e 4.

Na figura 3 A, a administração de formalina no lábio induziu um menor tempo de exploração dos braços abertos quando comparado aos demais grupos. A porcentagem de tempo gasta nos braços abertos está inversamente relacionada ao nível de ansiedade do animal, e portanto este resultado indica que a dor orofacial em tecido superficial (lábio) induziu aumento no nível de ansiedade em ratos.

Ainda na figura 3A, a análise estatística mostrou que não houve diferença significativa na porcentagem de tempo nos braços abertos entre os tratados com salina e

formalina no dorso, indicando que a formalina aplicada no dorso do animal não causou dor somática suficiente para desencadear um processo de ansiedade. Isso se confirma devido à porcentagem de tempo nos braços abertos do grupo tratado formalina dorso também não diferir do grupo controle anestesiado.

Na figura 3B está ilustrado o gráfico com a porcentagem de entradas realizadas nos braços abertos em cada grupo avaliado. A porcentagem de entradas realizadas nos braços abertos é um índice tanto do nível de ansiedade quanto da atividade locomotora do animal (CRUZ et al., 1994). A análise estatística constatou que o grupo tratado com formalina no lábio apresentou menor porcentagem de entradas nos braços abertos, comparado com os demais grupos, o que sugere que o grupo tratado com formalina no lábio, apresentou-se mais ansioso ou que sua atividade locomotora poderia estar diminuída. Com relação aos grupos Controle Anestesiado, Salina Lábio, Salina Dorso e Formalina Dorso, estes não apresentaram diferença estatística. Com esse resultado os grupo Salina no Dorso e Formalina no Dorso nos fazem concluir que a formalina aplicada no dorso não gerou aumento no nível de ansiedade ou alteração na atividade locomotora dos animais.

Na figura 3C foi ilustrado o número de entradas realizadas nos braços fechados, que é um índice da atividade locomotora do animal (CRUZ et al., 1994). Não houve diferenças significativas neste parâmetro entre os grupos analisados (Fig. 3C, $p > 0,05$). Assim, o dado referente à fig. 3B é indicativo de maior nível de ansiedade no grupo tratado com formalina no lábio. Além disso, a análise estatística mostrou que a administração de formalina no dorso também não alterou a atividade locomotora dos animais.

Na figura 4A está ilustrada a avaliação de risco que consiste no comportamento exploratório do animal no qual ele expressa o conflito entre a curiosidade e o medo (CRUZ et al. 1994; WEISS et al., 1998 e RODGERS et al., 1999). A avaliação de risco está diretamente relacionada com o nível de ansiedade e é medida pelo número de vezes que o animal se dirige ao centro do labirinto, mas não entra em outro braço. A análise da figura 4A mostra que não houve diferença na avaliação de risco entre os grupos observados ($p > 0,05$). A princípio esperaríamos, de acordo com os dados apresentados na Fig. 3, que o grupo tratado com formalina no lábio apresentasse uma maior frequência do comportamento denominado de avaliação de risco, porém isso não ocorreu. Talvez este comportamento não tenha sido sensível ao tratamento utilizado. Como se trata de um

parâmetro complementar, este resultado não invalida a interpretação dos dados ilustrados na Figura 3, descrita acima.

Na figura 4B está ilustrado o número de idas ao fim dos braços abertos. O número de vezes que o animal chega ao final do braço aberto é inversamente proporcional ao seu nível de ansiedade. Pudemos observar através do gráfico que o grupo tratado com formalina no lábio apresentou menor número de idas ao fim dos braços abertos, indicando maior nível de ansiedade ($p < 0,05$), sem diferença entre os demais grupos.

As dores orofaciais destacam-se das demais dores somáticas não só em função da sua grande intensidade e frequência de ocorrência (AGHABEIGI,1992) como também pela via de condução da informação dolorosa. A via trigeminal difere acentuadamente da via de condução da informação dolorosa proveniente das demais regiões somáticas (DUBNER,1986). Assim, através da comparação dos dados obtidos, afirmamos que a dor orofacial gerou maior ansiedade do que a dor somática, tendo em vista que a administração de formalina na região dorsal não induziu alteração na resposta ao teste do LCE nos animais analisados.

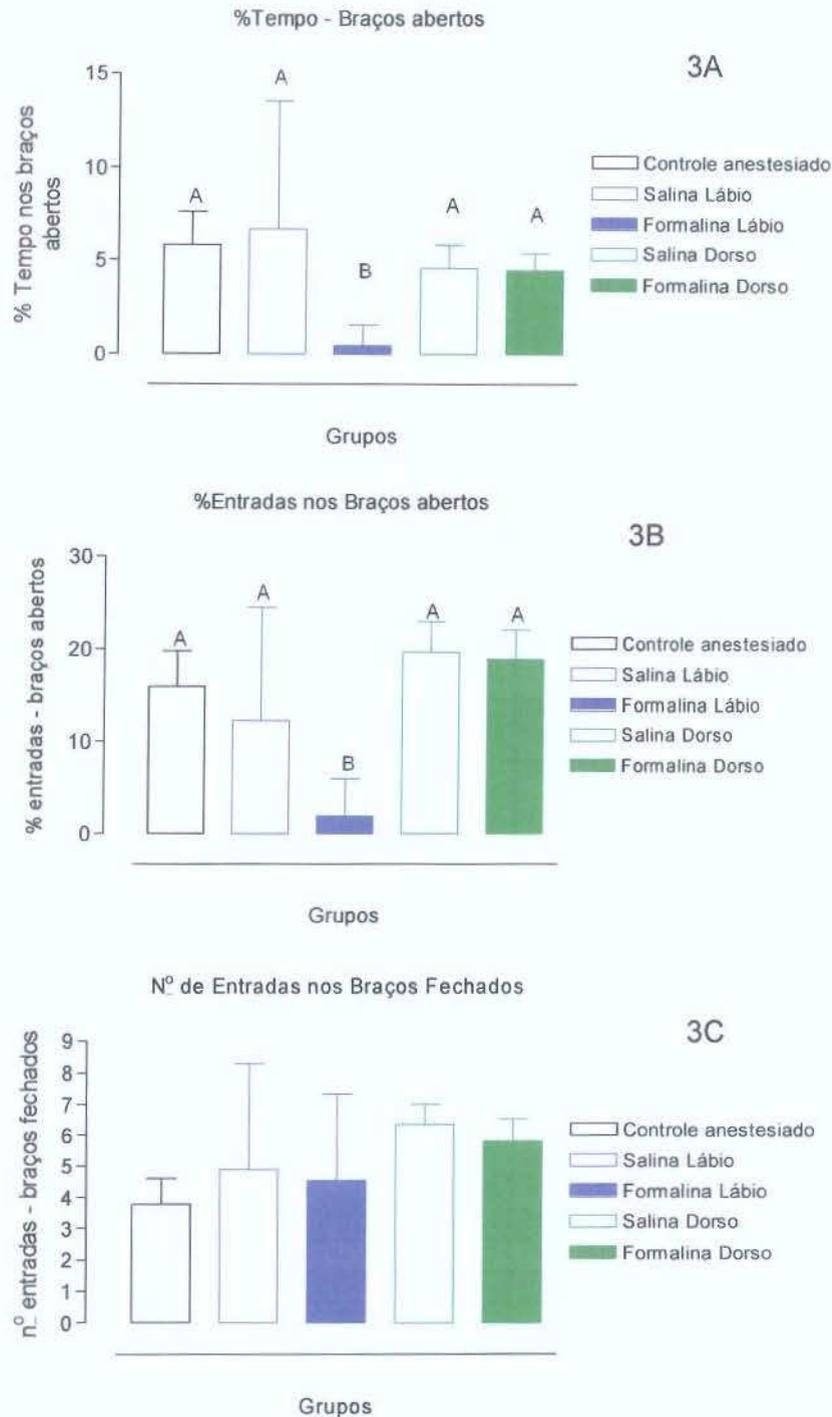


Figura 1. Porcentagem do tempo de exploração dos braços abertos (3A), porcentagem de entradas nos braços abertos (3B) e número de entradas realizadas nos braços fechados (3C) de ratos submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado após administração de anestesia superficial com halotano (controle anestesiado), injeção de salina ou formalina no lábio ou no dorso. N = 15 experimentos/grupo. Letras diferentes indicam grupos diferentes estatisticamente ($p < 0,05$).

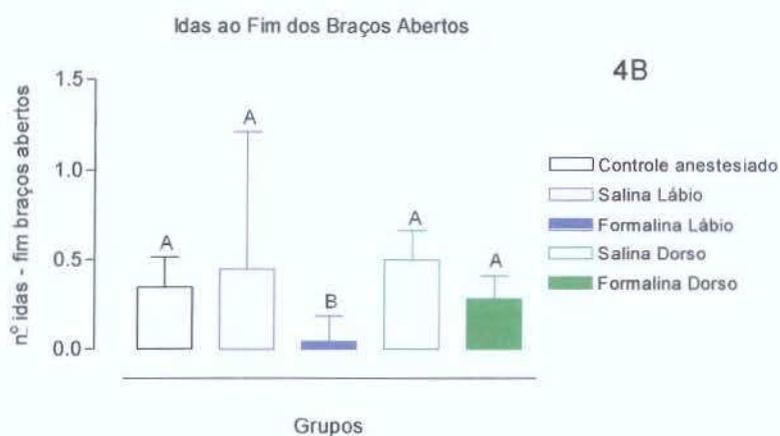
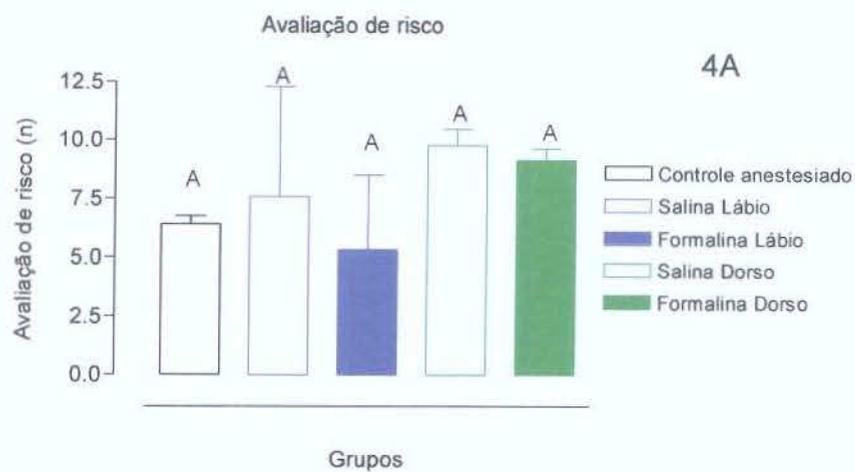


Figura 2. Avaliação de risco (4A) e idas ao fim dos braços abertos (4B) de ratos submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado após administração de anestesia superficial com halotano (controle anestesiado), injeção de salina ou formalina no lábio ou no dorso. N = 15 experimentos/grupo. Letras diferentes indicam grupos diferentes estatisticamente ($p < 0,05$).

O ácido gama-aminobutírico (GABA) é o mais potente neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central (SNC) dos vertebrados (FRANCIOLINI & PETRIS, 1990). A ativação do receptor GABA_A, por agonistas abre canais de cloreto, o que resulta em um aumento no influxo de cloreto e, conseqüentemente, na hiperpolarização da membrana neuronal (IMAMURA & PRASAD, 1998). A transmissão gabaérgica participa de forma importante na regulação da ansiedade (FERNANDEZ-GUASTI & PICAZO, 1990). O diazepam é um agente ansiolítico padrão, cuja ação se deve a sua ligação a sítios alostéricos do receptor GABA_A, o que potencializa a resposta deste receptor ao agonista endógeno GABA (RODGERS & JOHNSON, 1998).

A injeção subcutânea de formalina produz uma resposta nociceptiva sensível a drogas analgésicas (HUNKAAR & HOLE et al., 1987; TAYLOR et al., 1995). O paracetamol cruza a barreira hemato-encefálica e é distribuído uniformemente no cérebro quando administrado sistemicamente (BAMMWARATH et al., 1992; LANGE et al., 1994). Os mecanismos de ação central ainda estão sendo discutidos. A inibição da atividade da cicloxigenase central foi proposta por Malmberg et al. (1994) e Muth-Selbach et al. (1999), entretanto a maior hipótese é de que seu envolvimento está relacionado com o sistema serotoninérgico.

A serotonina (5-HT) é um componente supraespinal capaz de ativar o sistema serotoninérgico. A diminuição da ativação da 5-HT pode estar relacionada com a diminuição da alta afinidade cortical pelos receptores 5-HT_{2A} evocada pelo paracetamol. Isso pode ser ainda mais enfatizado tendo em vista que Pini et al. (1992) e Luigi *et al.* (1996) já descreveram que existe uma íntima relação entre tal diminuição de afinidade da 5-HT e o aumento da atividade analgésica. Como o paracetamol se mostrou eficaz na diminuição das respostas nociceptivas à administração de formalina na região orofacial (ROVERONI, *et al.* 2001), optamos por utilizá-lo como agente analgésico no presente estudo.

A seguir serão apresentados os resultados referentes aos efeitos da administração subcutânea de agente algésico (formalina) no lábio dos animais após a administração intraperitoneal de diazepam sobre as respostas observadas em resposta à dor orofacial superficial, ou após a administração oral de paracetamol. Estas análises foram feitas para validar farmacologicamente as respostas comportamentais no teste do LCE, ou seja, confirmar se as alterações na exploração do LCE realmente refletiam aumento no nível de ansiedade, e se o efeito ansiogênico observado se devia realmente à dor. Estes dados serão apresentados nas figuras 5 e 6.

Com relação a estas figuras destacamos que, embora tenhamos optado por não apresentar todos os dados no mesmo gráfico, informamos que não houve diferença significativa entre os grupos tratados somente com diazepam e somente com paracetamol, em relação ao grupo controle anestesiado. Portanto isto mostra que nem o diazepam, nem o paracetamol, por si só, alteram a resposta comportamental ao teste do LCE. Como já está demonstrado na literatura, o efeito destes agentes torna-se evidente somente quando o nível de ansiedade já está alterado (TREIT et al., 1988), ou quando existe resposta nociceptiva mensurável (Clavelou *et al.*, 199; Roveroni *et al.*, 2001).

Na figura 5A, a análise estatística confirmou que houve diferença significativa na porcentagem de tempo nos braços abertos entre o grupo tratado com formalina no lábio e os grupos tratados com formalina no lábio + diazepam e formalina no lábio + paracetamol. A porcentagem de exploração dos braços abertos dos grupos tratados com diazepam e com paracetamol + formalina no lábio foi significativamente maior em relação ao grupo tratado apenas com formalina no lábio.

Na figura 5B está ilustrado o gráfico com a porcentagem de entradas realizadas nos braços abertos em cada grupo avaliado. O grupo tratado com formalina no lábio apresentou um menor porcentagem de entradas nos braços abertos, comparado com os demais grupos. Isto sugere que o grupo tratado com formalina no lábio, apresentou-se mais ansioso ou que sua atividade locomotora poderia estar diminuída. Novamente, o tratamento com diazepam e o tratamento com paracetamol reverteram esta resposta ao apresentar diferença estatística em relação ao grupo tratado com formalina lábio.

Na figura 5C foi ilustrado o número de entradas realizadas nos braços fechados.

Verificando os dados da análise estatística, percebemos que não há diferença neste parâmetro entre os grupos analisados (Fig. 5C, $p > 0,05$). Assim, o dado referente à figura 5B é indicativo de maior nível de ansiedade no grupo tratado com formalina no lábio, não alterando a atividade locomotora dos animais.

Na figura 6A está ilustrada a avaliação de risco. Como já foi mencionado, esse comportamento expressa o conflito entre a curiosidade e o medo (CRUZ et al., 1994; WEISS et al., 1998; RODGERS et al., 1999). Assim, essa avaliação é medida pelo número de vezes que o animal se dirige ao centro do labirinto, mas não entra em outro. A análise estatística da figura 6A confirmou que o grupo tratado com formalina no lábio e com diazepam (i.p.) e outro grupo tratado com formalina no lábio e com paracetamol (via oral) se mostraram menos ansiosos em comparação ao grupo tratado com formalina no

lábio . Logo, o diazepam reverteu a ansiedade por ser uma droga ansiolítica e o paracetamol reverteu o quadro de dor que gerava a ansiedade.

A figura 6B ilustra as idas ao fim dos braços abertos. O número de vezes que o animal chega ao final do braço aberto é inversamente proporcional ao seu nível de ansiedade. Pudemos observar através da análise estatística que o grupo tratado com formalina no lábio apresentou menor número de idas ao fim dos braços abertos, indicando maior nível de ansiedade($p < 0,05$). No grupo tratado com formalina no lábio + diazepam (i.p.) esta resposta foi revertida, o que confirmaria que a resposta observada, no grupo tratado com formalina lábio, representa aumento no nível de ansiedade. O grupo tratado com formalina no lábio e administração oral de paracetamol apresentou um número de idas ao fim dos braços abertos maior do que o grupo tratado com formalina no lábio. Logo, o paracetamol cessou a dor causada pela formalina, e neste caso, a resposta ansiogênica não foi mais observada.

Assim, na presença do diazepam, o tratamento com formalina no lábio não mais alterou a resposta comportamental dos animais ao teste do LCE. Logo, a ação ansiolítica do diazepam diminuiu a tigmotaxia dos ratos (TREIT et al., 1988), e reverteu o aumento no nível de ansiedade induzido pela administração de formalina no lábio.

E como o tratamento com paracetamol também reverteu o aumento do nível de ansiedade observado após o tratamento com formalina no lábio, este resultado confirmou que a causa do aumento de ansiedade nos animais tratados como formalina no lábio era realmente a dor orofacial.

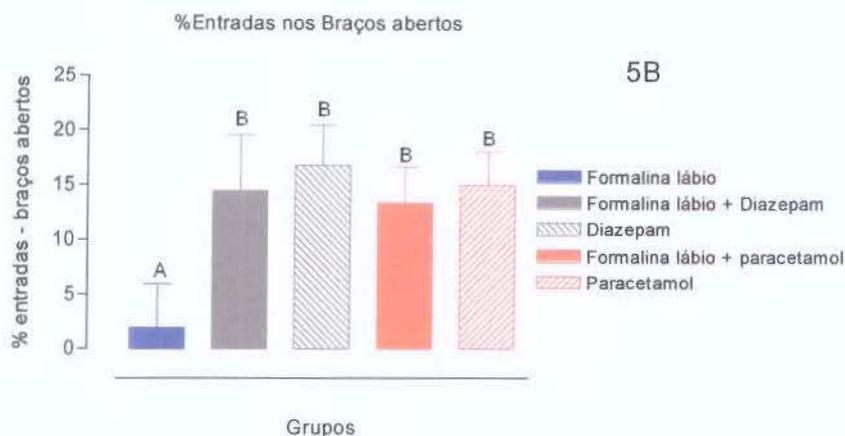
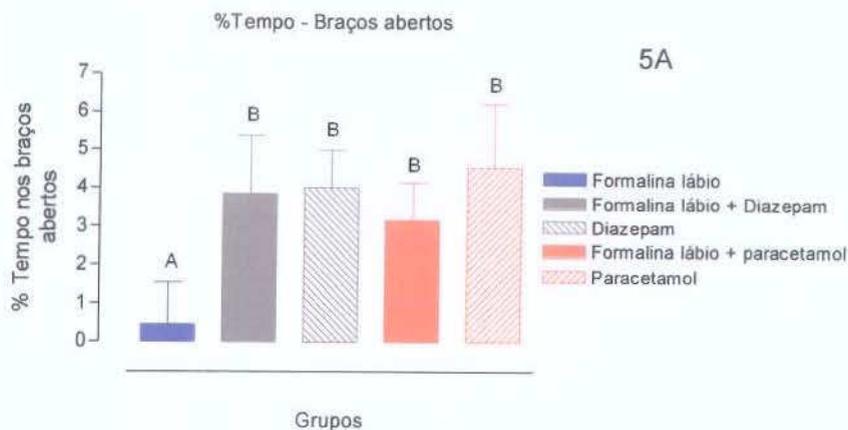


Figura 3. Porcentagem do tempo de exploração dos braços abertos (5A), porcentagem de entradas nos braços abertos (5B) e número de entradas realizadas nos braços fechados (5C) de ratos submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado após administração de formalina no lábio, diazepam ou paracetamol. N = 15 experimentos/grupo. Letras diferentes indicam grupos diferentes estatisticamente ($p < 0,05$).

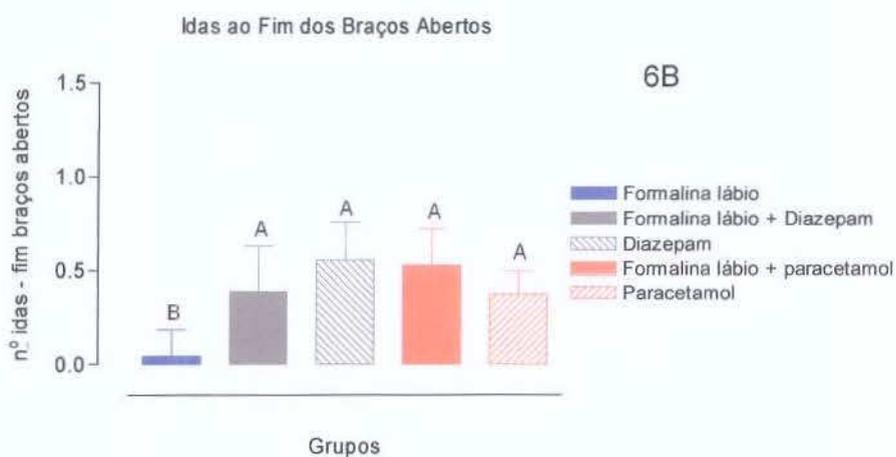
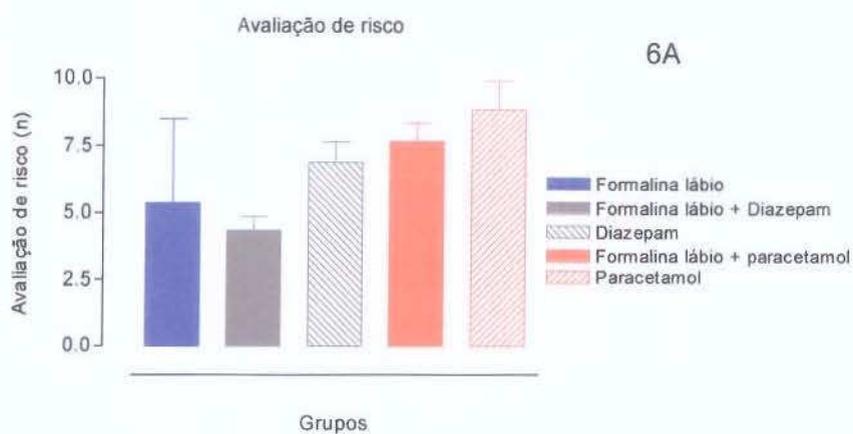


Figura 4. Avaliação de risco (6A) e idas ao fim dos braços abertos (6B) de ratos submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado após administração de formalina no lábio, diazepam ou paracetamol. N = 15 experimentos/grupo. Letras diferentes indicam grupos diferentes estatisticamente ($p < 0,05$).

4. Conclusão

Neste contexto, concluímos que a dor orofacial aumentou o nível de ansiedade em ratos. Além disso, a dor somática não gerou ansiedade nos animais. O efeito da injeção de formalina no dorso não gerou ansiedade, tendo em vista que os grupos tratados com formalina no dorso e salina no dorso se comportaram de forma semelhante no teste do labirinto em cruz elevado.

Também observamos que o diazepam reverteu o quadro de ansiedade, pois os animais tratados com injeção de formalina no lábio e diazepam permaneceram menos ansiosos em relação aos animais tratados apenas com a injeção de formalina no lábio.

Já o efeito ansiogênico observado foi realmente relacionado à dor. O pré-tratamento do animal com paracetamol como analgésico, antes da administração da formalina, tornou os animais pertencentes a este grupo menos ansiosos do que os animais os quais apenas injetamos formalina no lábio.

Contudo, se levarmos em consideração a dor e o estresse que podem ser gerados em um consultório odontológico, poderíamos diminuir a ansiedade causada pela dor tanto revertendo o quadro de dor com um pré-tratamento analgésico como revertendo a ansiedade com um pré-tratamento ansiolítico.

III. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGHABEIGI, B. The pathophysiology of pain. **Br Dent J.** **173**(3): 91-6, 1992.
- ALOISI A. M.; CECCARELLI, I. & LUPO, C. Behavioural and hormonal effects of restraint stress and formalin test in male and female rats. **Brain Res. Bull.** **47** (1): 57-62, 1998.
- BAMMWARTH B.; NETTER P; LAPICQUE F.; GILLET P.; PERE P.; BOCCARD E.; ROYER R. J.; GAUCHER A. Plasma and cerebrospinal fluid concentrations of paracetamol after a single intravenous dose of propacetamol. **Br J Clin Pharmacol** (34) 79-81,1992.
- BONNEFONT J.; ALLOUI A.; CHAPUY E.; CLOTTES E. Orally administered paracetamol does not act locally in the rat formalin test: evidence for a supraspinal, serotonin-dependent antinociceptive mechanism. **Anesthesiology** **99**(4) 976-981, 2003.
- CLAVELOU P, PAJOT J, DALLEL R, RABOISSON P. Application of the formalin test to the study of orofacial pain in the rat. **Neurosci Lett**, **103**:349– 353, 1989.
- CLAVELOU, P., *et al.* The orofacial formalin test in rats: effects of different formalin concentrations. **Pain**, **62**:295-301, 1995.
- CODERRE TJ, VACCARINO AL, MELZACK R. Central nervous system plasticity in the tonic pain response to subcutaneous formalin injection. **Brain Res**, **535**:155–158, 1990.
- CRUZ, A. P. M.; FREI, F. & GRAEFF, F. G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. **Pharmacol Biochem Behav**, **49**: 171 - 176, 1994.
- DALLEL R, RABOISSON P, CLAVELOU P, SAADE, M., WODA, A. Evidence for a peripheral origin of the tonic nociceptive response to subcutaneous formalin. **Pain**, **61**:11–16, 1995.
- DAO, T.T.T; LUND, J.P.& LAVIGNE, G.J. Comparison of pain and quality of life in bruxers and patients with myofascial pain of the masticatory muscles. **J Orofacial Pain**, **8** (4): 350-56, 1994.
- DOMINGOS, E.F.; TAMBELI, C.H. & MARCONDES, F.K. Avaliação da relação entre dor na região orofacial e ansiedade em um modelo animal. **17ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica**, Águas de Lindóia – SP. *Pesquisa Odontológica Brasileira*, **14** (suppl.): 31; 2000a.

- DOMINGOS, E.F.; TAMBELI, C.H. & MARCONDES, F.K. Level of anxiety in rats under halothane anesthesia. **3rd World Congress on Stress**, Dublin, Irlanda, 24-27/09/00. *Abstracts*, p. 40, 2000b.
- DUBNER, R. Pain control in dentistry: the anatomic and physiologic basis of orofacial pain. **Pain**, **8**:408-16, 1986.
- DUBUISSON, D., DENNIS, S.G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain**, **4**: 161-174, 1977.
- FERNÁNDEZ-GUASTI, A., PICAZO, O. The actions of diazepam and serotonergic anxiolytics vary according to the gender and the estrous cycle phase. **Pharmacol Biochem Behav**, **37**: 77-81, 1990.
- FRANCIOLINI, F.; PETRIS, A. Chloride channels in biological membranes. **Biochim Biophys Acta**, **1031**:247-259, 1990.
- GREEN, S. & HODGES, H. Animal models of anxiety. In: **Behavioural models in psychopharmacology**. Willner, P. (ed.), Cambridge University Press: 21-49, 1991.
- HUNSKAAR S., HOLE K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, **30**:104-114, 1987.
- HASS, D. A., *et al.* Development of an orofacial model of acute inflammation in the rat. **Archs Oral Biol**, **37**(5): 417-422, 1992.
- IMAMURA, N. & PRASAD, C. Increased GABA-gated chloride ion influx in the hypothalamus of low-anxiety rats. **Physiol Behav**, **64** (3): 415-417, 1998.
- LANGE E. C.; DANHOF M.; BOER A.G.; BREIMER D.D. Critical factors of intracerebral microdialysis as a technique to determine the pharmacokinetics of drugs in rat brain. **Brain Res** **666** 1-8, 1994
- LUIGI A. P.; SANDRINI M.; VITALE G. The antinociceptive action of paracetamol is associated with changes in the serotonergic system in the rat brain. **Eur J Pharmacol** **308** 31-40, 1996.
- MALMBERG A. B.; YAKSH T.L. Capsaicin-evoked prostaglandin E2 release in spinal cord slices: Relative effect of cyclooxygenase inhibitors. **Eur J Pharmacol**:**271** 293-9, 1994
- MARCONDES, F.K.; MIGUEL, K.J.; MELO, L. L. & SPADARI-BRATFISCH, R. C. Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze. **Physiol. Behav.**, **74** (4-5): 435-440, 2001.

MCBLANE, J.M. & HANDLEY, S.L. Effects of two stressors on behavior in the elevated X-maze: preliminary investigation of their interaction with 8-OH-DPAT.

Psychopharmacology, **116**: 173-182, 1994.

MUTH-SELBACH U.S.;TEGEDER I.;BRUNE K.;GEISSLINGER G. Acetaminophen inhibits spinal prostaglandin E2 release after peripheral noxious stimulation. **Anesthesiology** **91** 231-9,1999.

NICIPORCIUKAS, C.; AS-ROCHA, L. C. Avaliação etológica de ratos no teste do labirinto em cruz elevado torna modelo mais sensível a fármacos que modulam a ansiedade. XV Reunião Anual das Sociedades de Biologia Experimental, Caxambu, MG, agosto. **Anais**, p.115, 2000.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.E. & BRILEY, M. Validation of open-closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rats. **J Neurosci Meth**, **14**: 49-167,1985.

PINI L.A., SANDRINI M., VITALE G. The antinoceptive action of paracetamol is associated with changes in the serotonergic system in the rat brain. **Eur J Pharmacol** **308** 31-40 1996.

RANG, H.P.; DLE, M.M. & RITTER, J.M. **Pharmacology**. 3ed. Person Professional Ltd, 1995.

RODGERS, R.J., JOHNSON N.J.T. Behaviorally selective effects of neuroactive steroids on plus-maze anxiety in mice. **Pharmacol Biochem Behav**, **59**: 221-232, 1998.

RODGERS, R. J.; HALLER, J.; HOLMES, A.; HALASZ, J.; WALTON, T. J.; BRAIN, P. F. Corticosterone response to the plus - maze: High correlation with risk assessment in rats and mice. **Physiol Behav**, **68**: 47 - 53, 1999.

ROSLAND JH, TJOLSEN A, MAEHLE B, HOLE. The formalin test in mice: effect of formalin concentration. **Pain**, **42**:235–242, 1990.

ROSLAND, J.H. The formalin test in mice: the influence of ambient temperature. **Pain**, **45** (2):211-216,1991.

ROVERONI, R., *et al.* Development of a behavioral model of TMJ pain in rats: the TMJ formalin test. **Pain**, **94**:185–191, 2001.

SCHAIBLE H. G.; RICHTER F. Pathophysiology of pain. **Langenbecks Arch Surg** (389): 237-243, 2004.

SETEM, J.; SILVEIRA, R.; MORATO, S. Efeitos comportamentais e bioquímicos da restrição de água sobre o comportamento exploratório de ratos no Labirinto em Cruz

- Elevado, XV Reunião Anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental, Caxambu, MG, agosto, **Anais**, p.187, 2000.
- TAYLOR B.K., PETERSON M.A., BASBAUM A.I. Persistent cardiovascular and behavioral nociceptive responses to subcutaneous formalin require peripheral nerve input. **J Neurosci**, **15**:7575–7584, 1995.
- THRANE, B.T., *et al.* Emotional stress effects on immunity, gingivitis and periodontitis, **Euro J Oral Sci**, **104**: 327-334, 1996.
- TREIT, D., FUNDYTUS, M. Thigmotaxis as a test for anxiolytic activity in rats. **Pharmacol Biochem Behav**, **31**:959-962, 1989.
- TREIT, D.; MENARD, J. & ROYAN, C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus maze. **Pharmacol Biochem Behav**, **44**: 463 - 469, 1993.
- WEISS, S.M.; WADSWORTH, G.; FLETCHER, A. & DOURISH, C.T. Utility of ethological analysis to overcome locomotor confounds in elevated maze models of anxiety. **Neurosci Biobehav Rev**, **23**: 265-271, 1998.