UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

CLARISSA CAROLINA FERNANDES HERCULIANI

Perfil nociceptivo orofacial em ratos diabéticos

BAURU
2016

CLARISSA CAROLINA FERNANDES HERCULIANI

Perfil nociceptivo orofacial em ratos diabéticos

Dissertação apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas.

Área de concentração Biologia Oral

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Rigoldi Bonjardim

Versão corrigida

BAURU
2016

H418p Herculiani, Clarissa Carolina Fernandes
 Perfil nociceptivo orofacial em ratos diabéticos /
 Clarissa Carolina Fernandes Herculiani. – Bauru,
 2016.
 78 p. : il. ; 31cm.

 Dissertação – Faculdade de Odontologia de
 Bauru. Universidade de São Paulo

 Orientador: Prof. Dr. Leonardo Rigoldi
 Bonjardim

Nota: A versão original desta dissertação encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação/tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data: 01/05/2016

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: 005/2015
Data: 22/06/2015

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho

A Deus,

Pela sua bondade indiscutível.

Ao meu mentor espiritual Thomaz,

Por sempre estar comigo, iluminar o meu caminho e me ajudar em cada decisão

A minha mãe,

Pelo amor grandioso, por me apoiar em cada decisão, conselhos, broncas, por sempre estar ao meu lado, por ter me salvado e me mostrar o que é uma família.

Ao meu pai,

Por ser meu segundo anjo da guarda e sempre estar cuidando de mim.

A minha irmã e cunhado,

Por toda ajuda, companheirismo, momentos descontraídos e amor.

A minhas amigas,

Ariane Silva, Mari Pivetta e Jú: Oompa-Loompas of cience, obrigada pela paciência, ajuda e por ficarem com cheiro de rato comigo.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação da pós-graduação e aos membros do Departamento de Ciências Biológicas.

À Faculdade de Odontologia de Bauru, sob o comando do Profa. Dra. Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado.

À Comissão de apoio à pesquisa do estado de São Paulo (CAPES), que me proporcionou a bolsa de Mestrado.

Aos professores do Departamento de Ciências Biológicas, por passarem um pouco de seus conhecimentos.

Ao Prof. Dr. Leonardo Rigoldi Bonjardim

Por ter me recebido e por ter me orientado sempre com muita paciência. Obrigada por todo ensinamento transmitido!

Prof. Dr. Flávio Augusto Cardoso de Faria

Obrigada pela atenção e paciência durante momentos de angústia, e pela disposição em ajudar sempre.

Ao Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet por ter ajudado na leitura e análise das lâminas histológicas.

Ao técnico Thiago José Dionísio, por toda paciência e colaboração dentro do laboratório. Nenhum robô conseguirá te substituir.

À funcionaria Dalva Ribeiro de Oliveira (mãe de todos), que sempre me ajudou independente do dia, hora ou circunstância.

Aos funcionários do biotério, que sempre me receberam com um sorriso e tiveram paciência pra me ensinar tudo o que precisei.

Às meninas da histologia, Dani e Paty, obrigada pelas conversas e por terem me ensinado tudo o que precisei para a minha análise histológica.

À doutoranda Camila de Assis Fleury, por toda sabedoria compartilhada.

Dr. Yuri Martins Costa que me ajudou com a estatística da pesquisa.

Camila de Assis Fleury, Gabriela de Moraes Oliveira e André Pinhata

Por toda ajuda, amizade e parceria. A ajuda e atenção de vocês, tornou tudo mais fácil.

À amiga Jú, obrigada por ser minha melhor amiga, por me ajudar em cada momento difícil e por tornar cada momento, um pouquinho mais feliz.

Aos amigos da Microbiologia, André Luís da Silva, Dalva Ribeiro de Oliveira, Livia Maria de Melo, Gabriela Neubern, Nádia Amôr, Rudan Paraíso,

Aos professores membros da banca do exame de Qualificação, Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira, Prof. Dr. Leonardo Rigoldi Bonjardim e Prof. Dr. Flávio Augusto Cardoso de Faria, pelas sugestões, correções e dicas.

Aos professores membros da banca do exame de Defesa, Prof^a. Dr^a. Carolina Ortigosa, Prof. Dr. Flávio Augusto Cardoso de Faria e Prof. Dr. Leonardo Rigoldi Bonjardim, agradeço desde já pela disponibilidade em ler e recomendar correções à dissertação.

A todos os funcionários da FOB-USP pelo convívio harmonioso.

"Deus nos concede, a cada dia, uma página de vida nova no livro do tempo. Aquilo que colocarmos nela, corre por nossa conta.

Somos o que pensamos."

Chico Xavier

RESUMO

O presente estudo visou avaliar a influência da diabetes experimental no perfil nociceptivo orofacial de ratos. Foram utilizados 40 ratos Wistar, no qual 20 receberam injeção de estreptozotocina (STZ) para a indução da diabetes experimental (grupo diabetes), e 20 receberam solução de citrato de sódio (CS - grupo controle). Esses animais foram subdivididos em dois subgrupos de 10 ratos que apenas se diferenciaram com relação à substância que foi injetada no músculo masseter: solução salina isotônica (SI) [n=10: Cont-SI; n=10: Diab-SI] ou hipertônica (SH) [n=10: Cont-SH; n=10: Diab-SH]. Num primeiro momento foi feita a administração intraperitoneal de STZ ou CS e quatorze dias após, com os animais levemente anestesiados, foi realizada a injeção de 100 μ L de solução SH-5% ou SI-0,9% na região média do músculo masseter esquerdo, numa profundidade de 5 mm e então foi quantificado, por dois minutos, o comportamento nociceptivo caracterizado pelo ato do rato sacudir/agitar a pata posterior ipsilateral o que é aceito como índice de nocicepção muscular. Uma hora após a avaliação comportamental nociceptiva, os ratos foram eutanasiados por sobredose de anestésico e o músculo masseter esquerdo foi retirado com auxílio de um bisturi circular; parte deste músculo foi utilizada para a análise da expressão de RNA para as citocinas pró – inflamatórias [fator de necrose tumoral (TNF α), IL1 β , IL6, ciclooxigenase 2 (COX-2)] e anti – inflamatórias [IL- 2, IL- 10]] por meio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (qPCR); a parte restante foi corada pela técnica de hematoxilina-eosina e depois realizada a análise histopatológica descritiva em microscópio de luz. Foi observado um aumento significativo do comportamento nociceptivo nos ratos não diabéticos ou normoglicêmicos submetidos à injeção de SH (Cont-SH) em relação aos demais grupos que foram similares entre si. Na análise de citocinas, verificamos que o músculo masseter de ratos não diabéticos submetidos à injeção de SH (Cont-SH) apresentaram um aumento significativo da expressão relativa de TNF α em relação aos demais grupos que foram similares entre si; para a IL-1 β também foi verificada um aumento da expressão relativa do grupo (Cont-SH) em relação aos grupos Cont-SI e Diab-SI, mas não em relação ao grupo Diab-SH e a IL-6 foi significativamente mais expressa no músculo masseter de ratos não diabéticos submetidos à injeção de SH em relação ao grupo Cont-SI, mas não foi diferente nos demais grupos. As

demais citocinas avaliadas (COX-2, IL-2 e IL-10) não mostraram diferenças significativas entre os grupos. Na análise histopatológica não foram identificadas alterações significativas no tecido muscular, apenas um discreto infiltrado inflamatório no grupo Cont-SH. Diante dos resultados obtidos, podemos concluir que os ratos diabéticos apresentaram um reduzido comportamento nociceptivo, o que indica uma hiponocicepção química.

Palavras-chave: Diabetes mellitus; Nocicepção; Salina Hipertônica; Masseter.

ABSTRACT

Orofacial nociceptive profile in diabetic rats

This study aimed to evaluate the influence of experimental diabetes in rats nociceptive orofacial profile. 40 Wistar rats were used, in which 20 received streptozotocin injection (STZ) to induce experimental diabetes (group), and 20 received sodium citrate solution (CS - control group). These animals were divided into two groups of 10 rats differed only with respect to the substance that has been injected into the masseter: isotonic saline (IS) [n = 10: Cont-IS; n = 10: Diab-IS] or hypertonic (HS) [n = 10: Cont-HS; n = 10: Diab-HS]. Initially was taken intraperitoneal administration of STZ or CS and fourteen days with lightly anesthetized animal, injection of 100 μ L of 5% HS solution or 0.9% IS in the middle region of the left masseter muscle was performed at a depth of 5 mm and then was quantified for two minutes, the nociceptive behavior characterized by the rats act shake/agitating the ipsilateral hind paw which is accepted as muscle nociception index. One hour after the nociceptive behavioral evaluation, the rats were euthanized by overdose of anesthetic and the left masseter muscle was removed with the aid of a circular scalpel; part of this muscle was used for analysis of RNA expression for pro - inflammatory cytokines [tumor necrosis factor (TNF), IL1 β , IL6, cyclooxygenase 2 (COX-2)], and anti - inflammatory [IL-2, IL - 10] by reaction technique of quantitative polymerase chain (qPCR); the remaining half was stained with hematoxylin-eosin and then conducted a descriptive histopathological analysis by light microscopy. It was observed a significant increase of nociceptive behavior in non-diabetic and normoglycemic rats with injection of HS (Cont-HS) compared to other groups that were similar to each other. In cytokine analysis, we find that the masseter muscle of non-diabetic rats with injection of (Cont-HS) showed a significant increase in TNF relative expression compared to the other groups that were similar to each other; for IL-1 β was also found an increase of the group relative expression (Cont-HS) with respect to Cont-IS and Diab-IS groups, but not in relation to Diab-HS group and IL-6 was significantly expressed the masseter muscle of rats without diabetes underwent injection compared to Cont-IS group, but was not different in the other groups. On the evaluated cytokines (COX-2, IL-2 and IL-10) showed no significant differences between groups. Histologically significant changes were not found in muscle tissue,

just a mild inflammatory infiltrate in the Cont-SH group. Based on these results, we conclude that the diabetic rats had a reduced nociceptive behavior, which indicates a chemical hyponociception.

Key words: Diabetes mellitus; nociception; Hypertonic Saline; Masseter

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

Figura 1 – Fluxograma com a sequência dos experimentos.....39

Figura 2 – Fotomicrografia do músculo masseter de ratos em diferentes condições experimentais, HE, aumento de 10x e 40x.....47

- GRÁFICOS

Gráfico 1 – Avaliação da resposta comportamental nociceptiva nos diferentes grupos experimentais. Representação da média $\pm$ desvio padrão do comportamento nociceptivo.....42

Gráfico 2 – Expressão relativa de TNF α nos diferentes grupos experimentais. Representação da média $\pm$ desvio padrão da expressão relativa de TNF α43

Gráfico 3 – Expressão relativa de IL-1 β nos diferentes grupos experimentais. Representação da média $\pm$ desvio padrão da expressão relativa de IL-1 β44

Gráfico 4 – Expressão relativa de IL-6 nos diferentes grupos experimentais. Representação da média $\pm$ desvio padrão da expressão relativa de IL-6.....44

Gráfico 5 – Expressão relativa de COX-2 nos diferentes grupos experimentais. Representação da média $\pm$ desvio padrão da expressão relativa de COX-2.....45

Gráfico 6 - Expressão relativa de IL-2 nos diferentes grupos experimentais. Representação da média $\pm$ desvio padrão da expressão relativa de IL-2.....45

Gráfico 7 - Expressão relativa de IL-10 nos diferentes grupos experimentais. Representação da média $\pm$ desvio padrão da expressão relativa de IL-10.....46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Divisão dos grupos de acordo com o teste de nocicepção e a presença da diabetes.....36

Tabela 2 - Primers e sondas marcadas usados no ensaio de qPCR.....37

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

DM	Diabetes mellitus
STZ	Estreptozotocina
ATM	Articulação temporomandibular
SH	Salina hipertônica
SI	Salina isotônica
TNF	Fator de necrose tumoral
IL	Interleucinas
IDF	Federação Internacional da Diabetes
DPN	Neuropatia periférica diabética
SNC	Sistema nervoso central
FTC β	Fator transformador de crescimento β
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa
HE	Hematoxilina-eosina
Cont-SI	Salina isotônica
Cont-SI	Salina hipertônica
Diab-SI	Salina isotônica
Diab-SH	Salina hipertônica
SP	Substância P
CGRP	Gene da calcitonina
CT	Limiar de ciclo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	19
3	PROPOSIÇÃO	28
4	MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1	ANIMAIS	34
4.2	DELINIAMENTO EXPERIMENTAL	34
4.2.1	Indução de diabetes mellitus por estreptozotocina	34
4.2.2	Ensaio <i>In vivo</i>	35
4.2.3	Grupos experimentais	35
4.2.4	Ensaios <i>In Vitro</i>	36
	AVALIAÇÃO DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE	
4.2.4.1	QUANTITATIVA (qPCR)	36
4.2.4.2	AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DESCRITIVA	38
4.2.5	LINHA DO TEMPO DO ESTUDO	38
4.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
5	RESULTADOS	40
5.1	ANÁLISE DE COMPORTAMENTO NOCICEPTIVO	42
5.2	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE CITOCINAS	42
5.3	ANÁLISE HISTOLÓGICA	47
6	DISCUSSÃO	48
7	CONCLUSÕES	57
	REFERÊNCIAS	61
	APÊNDICES	73
	ANEXOS	77

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde a diabetes mellitus (DM) é definido como sendo uma doença crônica que ocorre quando o pâncreas não produz insulina suficiente (tipo 1) ou relacionada a uma resistência insulínica a partir do tecido-alvo (Tipo 2) (VERNILLO, 2001; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015). Esta patologia tem origem multifatorial e se desenvolve a partir da interação entre fatores ambientais e predisposição genética (SALGADO, 2007; NOLAN et al., 2011).

As principais complicações da doença são aumento da susceptibilidade à infecção, cicatrização demorada, retinopatia, nefropatia, doenças micro e macrovasculares e neuropatia (NGUYEN et al., 2015). Neuropatia periférica diabética é uma complicação comum de ambos os tipos de diabetes e, mais comumente, ela se manifesta com a alteração da sensibilidade. Afeta até 50% dos pacientes diabéticos e é uma das principais causas de morbidade e mortalidade (TESFAYE; SELVARAJAH, 2012). Os pacientes com neuropatia diabética podem experimentar uma variedade de sensações, incluindo dor espontânea, alodinia e hipernocicepção, que são muitas vezes concomitantes com uma paradoxal perda de sensação evocada por estímulo (YAMAMOTO et al., 2009).

Um dos meios de se estudar a diabetes em animais de experimentação, como ratos, é por meio da administração de estreptozotocina (STZ), um antibiótico extraído a partir de *Streptomyces achromogenes* (ALI et al., 2012; XIE et al., 2015). A indução do por injeção de estreptozotocina (STZ), induz diabetes experimental por destruir seletivamente as células β nas ilhotas pancreáticas (SZKULDELSKI, 2001). Por sua semelhança com a glicose, a molécula de STZ entra na célula β através do transportador de glicose GLUT 2 (TJASLVE et al., 1976) e sua atuação intracelular tóxica da é pela atividade alquilante do grupamento metil-nitrosurea, que modifica o grupo metil para a molécula de DNA. Em resposta a esse dano, a enzima poli-ADP-ribose polimerase tem sua ativação exacerbada, reduzindo NAD^+ e os estoques de ATP. Toda essa ação resulta em necrose das células β (LENZEN, 2008; LOBO, 2013). Estudos têm mostrado que uma injeção sistêmica de STZ induz hipernocicepção térmica, mecânica (CUNHA et al., 2009; CHRISTOPH et al., 2010; BISHNOI et al., 2011) e química na pata traseira dos roedores (HASSANEIN, 2011; PABREJA et al., 2011). Existe também evidência de que o nervo trigeminal pode ser

afetado (TROGER et al., 1999), o que fica evidente pela hipernocicepção térmica orofacial em ratos diabéticos (RODELLA et al., 2000; ZIEGLER, 2008; PIHUT et al., 2014; XIE et al., 2015).

Ainda, na região orofacial, alguns estudos não têm encontrado alterações significativas das respostas nociceptivas a estímulo mecânico e químico entre ratos diabéticos e não diabéticos (NONES et al., 2013). Em outra direção, alguns outros estudos têm encontrado uma hiponocicepção na articulação temporomandibular (ATM) de ratos diabéticos (MUZILLI JUNIOR, 2014) e que pacientes diabéticos apresentaram maior limiar de dor em áreas inervadas pelo nervo trigêmeo e que essa diminuição da sensibilidade dolorosa foi associada com maior nível glicêmico (ARAP et al., 2010).

Também em humanos, foi verificado que indivíduos que apresentavam diabetes e dor orofacial diferiram significativamente em muitas características de dor e comportamento emocional, indicando que embora seja conhecida a associação de diabetes com dor neuropática, a dor nociceptiva também é agravada pela diabetes (RAHIM-WILLIAMS et al., 2010).

Na região orofacial, esse agente álgico tem sido utilizado para indução de dor muscular em masseter tanto em humanos (BENDIXEN et al., 2013; AKHTER et al., 2014) quanto em modelos animais (CAIRNS et al., 2008; et al., 2012).

Nessa direção e sendo a dor muscular uma das principais queixas de dor na região orofacial, o presente estudo utilizou-se da administração de salina hipertônica (SH) em músculo esquelético, o que tem sido aceita como modelo para estudar mialgia em diferentes segmentos corporais (SÁNCHEZ; MA; BAGÜES; MARTÍN, 2010). Além disso, o nosso estudo lança mão de um modelo de dor muscular experimental que mimetiza a mialgia que ocorre em humanos. Nesta perspectiva, nossa hipótese nula foi que o comportamento nociceptivo evocado pela administração de salina hipertônica, bem como o processo inflamatório em músculo masseter é igual entre ratos diabéticos e não diabéticos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

A diabetes mellitus é uma doença metabólica caracterizada pela hiperglicemia resultante da falha da secreção ou na ação da insulina, sendo dividida em dois tipos: tipo 1 que é a diabetes insulino dependente, ou seja, está relacionada à destruição autoimune das células β pancreáticas, que são responsáveis pela produção da insulina, podendo levar à perda total da secreção deste hormônio; tipo 2 caracterizada por ser a diabetes não insulino dependente e está relacionada à resistência celular à insulina, por alterações na molécula de insulina ou alterações nos receptores celulares deste hormônio (MEALEY, 1999; DONAHUE; WU, 2001; TARIQ et al., 2016). A maioria dos pacientes diabéticos tipo 2 são obesos ou tem uma alta taxa de gordura corporal, principalmente, na região abdominal. O tecido adiposo contribui para o aumento da resistência celular à insulina, devido ao aumento nos níveis sanguíneos de ácidos graxos livres derivados de adipócitos, menor secreção de adiponectina e aumento da produção de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α , sigla em inglês), interleucina 6 (IL-6) e proteína C reativa (MEALEY; OATES, 2006; YOUSEFZADEH; ALIPOUR; SOUFI, 2015).

Já considerada como uma epidemia, a Federação Internacional da Diabetes (International Diabetes Federation – IDF) estima que atualmente o número de adultos com diabetes no mundo seja 347 milhões, representando 8,3% da população. Este número deverá aumentar para 552 milhões de pessoas até o ano de 2030. A IDF ainda estima que aproximadamente 183 milhões de pessoas não saibam que têm a doença (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2015). No Brasil, foi estimada uma prevalência de 7,6% na população adulta no final da década de 1980 (MALERBI; FRANCO, 1992). Estudos mais recentes têm indicado taxas elevadas, como 13,5% em São Carlos-SP (BOSI et al., 2009) e de 15% em Ribeirão Preto-SP (MORAES et al., 2010). Outro estudo investigou a razão de prevalência da DM nas diferentes regiões geográficas do país, no período 2002-2007, observando alta prevalência de DM, com destaque para o Distrito Federal e o Estado do Maranhão (DIAS; CAMPOS, 2012).

As principais complicações crônicas da doença são aumento susceptibilidade à infecção e cicatrização demorada, retinopatia, nefropatia, neuropatia, doenças micro e macrovasculares (LOE, 1993, YOUSEFZADEH; ALIPOUR; SOUFI 2015). Também têm sido verificadas manifestações orais, tal

como a xerostomia (boca seca), paladar afetado, sialose (produção excessiva de secreção salivar) e pode também afetar a progressão de algumas doenças, tais como a cárie dentária, doença periodontal, lesões dos tecidos moles e infecções fúngicas (LEITE et al., 2008; SUN et al., 2012;). Um estudo recente verificou que as lesões orais ocorreram em 78,4% dos pacientes diabéticos, sendo as úlceras traumáticas e a queilite actínica as alterações mais comuns (LIMA et al., 2013; SILVA et al., 2015).

Especificamente a neuropatia periférica diabética (DPN, sigla em inglês) é uma complicação comum de ambos os tipos de diabetes e, mais comumente, ela se manifesta com alterações de sensibilidade. Afeta até 50% dos pacientes diabéticos e é uma das principais causas de morbidade e mortalidade (TESFAYE; SELVARAJAH, 2012; SINGH; KISHORE; KAUR, 2014). A patogênese da DPN ainda é controversa devido a sua natureza multifatorial, mas se sabe que a hiperglicemia crônica parece ter um papel crucial na iniciação de vários eventos metabólicos bioquímicos subjacentes à DPN (SIMA; SUGIMOTO, 1999; SHAMSI et al., 2014; SINGH; KISHORE; KAUR, 2014). São descritas como distúrbios no sistema nervoso periférico, ocasionados por alterações estruturais nas fibras neuronais como rompimento das células de Schwann (desmielinização), degeneração e perdas axonais; lesões microvasculares e alterações nas sinalizações bioquímicas intracelulares (AREZZO; ZOTOVA, 2002). Os pacientes com neuropatia diabética podem experimentar uma variedade de sensações, incluindo dor espontânea, alodinia (percepção de dor em resposta a estímulos normalmente não dolorosos) e hiperalgesia (sensação exagerada de dor a estímulos normalmente dolorosos), que são muitas vezes concomitantes com uma paradoxal perda de sensação evocada por estímulo (YAMAMOTO et al., 2009; ZHAO et al., 2015).

Um dos meios de se estudar a diabetes em animais de experimentação, como ratos e seu impacto na dor, é por meio da administração de estreptozotocina (STZ). A estreptozotocina, um antibiótico extraído a partir de *Streptomyces achromogenes*, é um dos agentes químicos mais comumente utilizados para induzir diabetes experimental (ALI et al., 2012). Uma injeção sistêmica de STZ tem sido associada à hiperalgesia térmica, mecânica (CUNHA et al., 2009; CHRISTOPH et al., 2010; BISHNOI et al., 2011) e química na pata traseira dos roedores (HASSANEIN, 2011; PABREJA et al., 2011). Existe também evidência de que o nervo trigeminal pode ser

afetado (TROGER et al., 1999), no entanto os resultados com relação ao tipo de alteração sensorial produzida nesse segmento são controversos.

Um estudo prévio avaliou mudanças sensoriais orofaciais em ratos com diabetes induzida por STZ e verificou que esses animais não responderam diferente do grupo controle aos estímulos químico (formalina) e térmico (filamentos de Von Frey) e desenvolveram hiperalgesia orofacial térmica ao frio e ao calor (HASSANEIN, 2011; NONES et al., 2013), o que também foi verificado por Xie et al. (2015).

Em outra direção, uma pesquisa recente indicou uma hiponocicepção química (formalina e capsaicina) na ATM de ratos diabéticos (MUZILLI JUNIOR, 2014). Da mesma forma, foi observado que pacientes diabéticos apresentaram maior limiar de dor em áreas inervadas pelo nervo trigêmeo e que essa diminuição da sensibilidade dolorosa foi associada com maior nível glicêmico e de hemoglobina glicada (ARAP et al., 2010; PORPORATTI et al., 2015).

Como pode ser visto, a influência da diabetes na dor tem sido mensurada por meio de testes que avaliam o limiar de detecção térmica e mecânica ou por meio da quantificação das respostas comportamentais nociceptivas frente a diferentes estímulos químicos, como a formalina e a capsaicina, os quais foram administrados na ATM e lábio superior. Uma vez que a dor muscular é uma das mais frequentes queixas de dor no segmento orofacial (HOWARD; WIENER; WALKER, 2014), é também importante avaliar o impacto da diabetes na nocicepção originada de estruturas musculares (REICHLING; GREEN; LEVINE, 2013; MCKELVEY et al., 2015).

Dentre os agentes álgicos usados para indução da dor em músculo masseter destaca-se a salina hipertônica. Em 2003, Ro, Capra e Masri, desenvolveram um modelo experimental de avaliação comportamental da dor muscular orofacial, caracterizado pela administração de salina hipertônica (5%) em ratos levemente anestesiados. A resposta comportamental nociceptiva quantificada nesse modelo é o comportamento de sacudir/agitar a pata traseira ipsilateral por um período de 2 minutos o qual é similar ao comportamento de coçar a região orofacial após a administração de formalina no lábio superior (CLAVELOU et al., 1989) ou na região da ATM (ROVERONI et al., 2001) de ratos acordados.

A injeção de salina hipertônica é um método amplamente empregado para a indução de dor muscular experimental e vem sendo utilizado tanto em estudos com animais quanto com humanos (BARANIUK, 1999; RO et al., 2007; LOUCA et al., 2014) e, é considerado um modelo válido de mialgia na região orofacial (SVENSSON; LIST; HECTOR, 2001). Embora o mecanismo exato pelo qual a salina hipertônica (SH) induz dor muscular não é totalmente esclarecido, sugere-se que ocorra a ativação de canais de sódio das fibras aferentes musculares de pequeno diâmetro (GRAVEN-NIELSEN; MENSE, 2001), e a ativação de neurônios no sistema nervoso central (SNC) que codificam informação nociceptiva (SVENSSON; GRAVEN-NIELSEN, 2001). Na região trigeminal a injeção intramuscular de SH em músculo masseter ativa de forma confiável um grupo de neurônios trigeminais no SNC que processam as informações provenientes de fibras aferentes musculares de pequeno diâmetro e de alto limiar de excitação que respondem a estímulos nocivos (RO; CAPRA, 1999; KODAIRA; INUI; KAKIGI, 2014, KUKIDOME et al., 2015) e produz respostas comportamentais nociceptivas estereotipadas (Ro, Capra, Masri, 2003), as quais podem ser mensuradas. A ação da SH também está associada ao aumento de alguns biomarcadores de dor muscular, como serotonina e glutamato (RO et al., 2007; LOUCA et al., 2014).

Muitas condições de dor musculoesquelética podem envolver a liberação de citocinas. Algumas citocinas podem ter ações pró ou anti-inflamatórias, conforme o microambiente no qual estão. Dentre as consideradas pró-inflamatórias, temos as interleucinas (IL) 1, 6, 7 e TNF (fator de necrose tumoral) e as anti-inflamatórias são IL-2, IL-4, IL-10, IL-13 e FTC β (fator transformador de crescimento β) (ALI et al., 1998, 2015). São mediadores imprescindíveis para conduzir a resposta inflamatória aos locais de infecção e lesão, favorecendo a cicatrização da ferida (OLIVEIRA et al., 2011). Podem atuar no local onde são produzidas, em células próximas ou liberadas para circulação, com efeitos à distância (CARDOSO; GONÇALVES, 2002; KRAYCHETE; CALASANS; VALENTE, 2006; LINS et al., 2010).

No processo inflamatório ocorre um aumento de expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias produzidas por macrófagos ativados. Há vasta evidência do papel de algumas delas como IL-1 β , IL-6, e TNF- α no processo de dor patológica (ZHANG; AN, 2007). As citocinas podem sensibilizar diretamente nociceptores e aumentar a sensibilidade neuronal ao calor, e estímulos mecânicos e químicos (JIN;

GEREAU, 2006; MENG et al., 2013). As citocinas inflamatórias, tais como a interleucina (IL) -1 e o fator de necrose tumoral (TNF- α), contribuem para a dor e hipernocicepção indiretamente através da indução da produção de agentes inflamatórios que sensibilizam os nociceptores (POOLE et al., 1995). Além disso, as citocinas inflamatórias são potentes moduladores da expressão de muitos receptores envolvidos na dor e analgesia (KHAN et al., 2008).

O TNF- α pode ser produzido por macrófagos, linfócitos ou monócitos (BINGHAM, 2002). O TNF- α tem mostrado ter um papel importante na hiperalgesia inflamatória e neuropática (WOOLF; ALLCHORNE; SAFIEH-GARABEDIAN, et al., 1997; CREANGE et al., 1997). Injeção intraplantar de TNF- α também produziu hiperalgesia mecânica e térmica (CUNHA; POOLE; LORENZETTI, et al., 1992).

A IL-1 β é primariamente produzida por macrófagos e monócitos, mas também por células não imunológicas, como fibroblastos e células endoteliais que são ativadas durante lesão celular, infecção, invasão e inflamação. A IL-1 β é expressa em neurônios nociceptivos do gânglio da raiz dorsal (ZHANG; AN, 2007; DE OLIVEIRA et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2011) pode produzir hiperalgesia após injeção intraplantar, intraperitoneal e intracerebroventricular (WATKINS et al., 1994) e pode aumentar a produção de substância P e prostaglandina E₂ em células neuronais e gliais (JEANJEAN; MOUSSAOUI; MALOTEAUX, et al., 1995; SCHWEIZER; FEIGE; FONTANA, et al., 1988).

A IL-6 é secretada por células T e macrófagos que vão estimular a resposta imune, como, durante infecções e depois de traumas, especialmente queimaduras ou outros danos em tecidos que conduzem à inflamação (MACHADO et al., 2004). A IL-6 tem mostrado ter um papel central na reação neuronal à injúria do nervo, parece estar envolvida na regulação neuronal da expressão de neuropeptídeos (KLEIN; MOLLER; JONES, et al., 1997) e sua infusão intratecal induziu alodinia tátil e hiperalgesia térmica em ratos intactos e com injúria do nervo (DELEO; COLBURN; NICHOLS, et al., 1996).

A interleucina 10 (IL-10) é um inibidor de macrófagos ativos, e realiza um importante papel no controle homeostático da imunidade celular e das reações da imunidade inata (COUPER; BLOUNT; RILEY, 2008).

A interleucina-2 (IL-2) tem a função clássica de promover a proliferação de células T e induzir a maturação de linfócitos B. No sistema imune a IL-2 é capaz de exercer inúmeras funções nos diferentes tipos celulares (SOUZA, 2006).

Assim, pode-se verificar que embora existam muitos estudos que investiguem a relação entre diabetes e saúde oral, poucos são aqueles que investigam o impacto da diabetes na dor orofacial, especialmente relacionados à dor musculoesquelética.

3 PROPOSIÇÃO

Proposição

3 PROPOSIÇÃO

Geral

Avaliar a influência da diabetes experimental no perfil nociceptivo orofacial de ratos.

Específicos

- Comparar entre ratos com e sem diabetes:
 - O comportamento nociceptivo induzido por salina hipertônica;
 - A expressão de RNAm para TNF α , IL1 β , IL6, COX 2, IL-2 e IL-10, utilizando como ferramenta a técnica de qPCR real time (Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa);
 - As alterações histológicas em masseter.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados 40 ratos machos Wistar (200 - 250 g) provenientes do Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Bauru-USP. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura, umidade e ciclo claro-escuro (12 h), sendo oferecida alimentação e água, “*ad libitum*”.

Os experimentos foram conduzidos durante a fase clara, entre 8 h e 17 h, em uma sala apropriada, com temperatura controlada em $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Cada animal foi inicialmente manipulado pelo examinador por um período de 3 dias antes do início dos experimentos, a fim de habituar-se ao local de experimentação e minimizar o estresse em relação ao ambiente e ao examinador.

Os procedimentos experimentais seguiram os padrões de Ética Internacional para experimentos que induzem dor em laboratórios de experimentação animal (ZIMMERMANN, 1983). Esta pesquisa teve início após parecer favorável da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, da FOB-USP, protocolo número 005/2015 (Anexo 1).

4.2. Delineamento Experimental

4.2.1. Indução de diabetes mellitus por estreptozotocina

Os ratos Wistar foram pesados para o cálculo da quantidade de estreptozotocina a ser utilizada. Os frascos de estreptozotocina (Streptozotocin - Sigma-Aldrich Co. LLC.) foram armazenados em freezer com temperatura entre 0 e -20°C antes de sua utilização. No dia da indução da diabetes experimental, a quantidade total de estreptozotocina foi pesada e dissolvida em veículo (solução de citrato de sódio 0,1M, pH = 4,5) (CORREIA-SANTOS, 2012) para obtenção de uma solução a 50 mg/mL. Alíquotas foram separadas em seringas de 1 mL para injeção via intraperitoneal com quantidades equivalentes à dose de 60 mg/kg de peso (DAVIDSON et al., 2012). Três dias (72h) após a injeção de STZ, a glicemia basal foi testada através de sangue periférico da cauda dos animais, após limpeza da mesma com álcool 70%, utilizando o aparelho glicosímetro OneTouch Ultra (OneTouch® -

Johnson & Johnson, Medical Devices & Diagnostic Group). Ratos com a glicemia acima de 250 mg/dl foram considerados diabéticos (AGRAWAL et al., 2014) e incluídos no estudo.

4.2.2. Ensaio *In vivo* - Teste de nocicepção orofacial induzida pela administração de salina hipertônica em músculo masseter

A avaliação do comportamento nociceptivo orofacial foi realizado em ratos levemente anestesiados com tiopental sódico 40 mg/kg, i.p. (Thiopentax®, Cristália - Produtos Químicos e Farmacêuticos), como descrito previamente (RO; CAPRA; MASRI, 2003; RO, 2005), no 14º dia após a indução da diabetes experimental.

O nível de anestesia "leve" foi determinado por meio de um estímulo nocivo à cauda ou na pata traseira com pinça serrilhada (RO et al., 2007). Animais tipicamente respondem ao estímulo nocivo da cauda com uma constrição abdominal e com um reflexo de retirada da pata traseira no prazo de 30 minutos após a anestesia inicial. Assim, os experimentos só continuaram após os ratos apresentarem respostas reflexas para cada estímulo nocivo como anteriormente descrito (RO et al., 2007; SÀNCHEZ et al., 2012; YOU et al., 2013).

Com os animais levemente anestesiados, mas exibindo respostas reflexas, foi realizada a injeção (agulha de calibre 30 ligada a uma seringa de insulina) de 100 uL de solução salina hipertônica (SH-5%) ou salina isotônica (controle, SI-0,9%) na região média do músculo masseter esquerdo, numa profundidade de 5 mm e então foi quantificado o comportamento nociceptivo caracterizado pelo ato do rato sacudir/agitar a pata posterior ipsilateral o que é aceito como índice de nocicepção muscular (RO; CAPRA; MASRI, 2003; RO, 2005; SIMONIC-KOCIJAN et al., 2013; AGRAWAL et al., 2014). Esse comportamento nociceptivo foi mensurado por um único experimentador por um período de 2 minutos. Todas as sessões de experimento foram gravadas em vídeo e depois reproduzidas o que também ajudou a manter a consistência dos resultados (SÀNCHEZ et al., 2010).

4.2.3. Grupos experimentais

De acordo com o teste de nocicepção e a presença ou não de diabetes, o presente estudo teve dois grupos experimentais, cada um dividido em dois

Resultados

subgrupos (Tabela 1). O grupo 1 (controle) foi constituído de 20 animais em que não foi induzida a diabetes experimental, apenas administrado o veículo da estreptozotocina citrato de sódio (0,1 M, pH 4,5) (CORREIA-SANTOS, 2012). Esses 20 animais foram divididos em dois subgrupos de 10 ratos que apenas se diferenciaram com relação à substância que foi injetada no músculo masseter, ou SI-0,9% ou SH-5%. No grupo 2 (diabetes), por sua vez, foi induzido a diabetes experimental com estreptozotocina em 20 animais; eles também foram subdivididos em dois grupos de 10 ratos que apenas se diferenciaram com relação à substância que foi injetada no músculo masseter, ou solução salina isotônica SI-0,9% ou hipertônica SH-5%. Seguem abaixo os grupos com sua identificação:

GRUPO	NÚMERO DE ANIMAIS	TESTE DE NOCICEPÇÃO	DIABETES EXPERIMENTAL
Cont-SI	10	Salina isotônica	Não
Cont-SH	10	Salina hipertônica	Não
Diab-SI	10	Salina isotônica	Sim
Diab-SH	10	Salina hipertônica	Sim

Tabela 1 – Divisão dos grupos de acordo com o teste de nocicepção e a presença da diabetes.

4.2.4. Ensaios *In Vitro*

4.2.4.1 Avaliação de Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (qPCR)

Após uma hora do início dos testes de nocicepção orofacial, os ratos foram eutanasiados por sobre-dose de pentobarbital de sódio (100 a 200 mg/kg por animal) e com o auxílio de um bisturi circular, tesoura cirúrgica e pinça foi removido o músculo masseter esquerdo numa área de 1 cm² e dividido ao meio, sendo uma parte utilizada para análise histológica descritiva e a outra metade para análise de qPCR (SIMONIC-KOCIJAN et al., 2013).

Para análise de qPCR, o músculo masseter foi congelada em nitrogênio líquido e armazenada em freezer -80°C (LEITE et al., 2014). Primeiramente foi realizada a extração do RNA das amostras, foram descongeladas e transferidas

para tubo de microcentrífuga contendo a solução de lise celular do RNeasy Mini Kit (Qiagen®, Germany). Para a extração do RNA, a etapa seguinte consistiu-se na homogeneização dos tecidos nesta solução seguida de uma centrifugação para separar os restos celulares do sobrenadante que contém o RNA. Este sobrenadante foi transferido para outro tubo contendo álcool absoluto, e esta mistura foi colocada numa coluna de sílica presente no kit, que retém o RNA. Duas lavagens, com soluções específicas do kit, foram providas nestas colunas e a última etapa constituiu na eluição do RNA após a adição de água livre de RNase nas colunas contendo o RNA. Após, 1 µg do RNA total foi transcrito com o Quanti Tect Reverse Transcription Kit (Qiagen®, Germany), de acordo com as orientações do fabricante. Após a transcrição reversa, os DNAs complementares (cDNAs) foram misturados ao Taqman gene expression master mix (Applied Biosystems, USA) o que contém a enzima taq polimerase, as base nitrogenadas A, T, C e G, o cloreto de magnésio e o tampão que confere à reação as condições ideais de amplificação. A esta mistura foram adicionados os primers e sondas marcadas com o fluoróforo FAM para a detecção e quantificação dos alvos em estudo. Os números de catálogo dos ensaios que contêm estes primers e sondas marcadas podem ser observados na Tabela 2.

Alvo	Número de catálogo (Applied Biosystems, USA)
COX 2	Rn01483828_m1
TNFα	Rn01525859_g1
IL 1β	Rn00580432_m1
IL-2	Rn00587673_m1
IL6	Rn01410330_m1
IL-10	Rn00563409_m1

Tabela 2 - Primers e sondas marcadas usados no ensaio.

Após o preparo das reações em placas de 384 poços (Applied Biosystems, USA), as mesmas foram alocadas no aparelho de qPCR Viia 7 (Applied Biosystems, USA) e as seguintes condições de ciclagem foram utilizadas para a realização das amplificações: temperatura inicial de 95°C por 10 minutos para a

ativação da taq polimerase seguido de 45 ciclos de 95°C por 15 segundo e 60°C por 1 minuto.

Para o estabelecimento das expressões relativas, de cada gene em estudo, à expressão do gene beta actina (gene de referência), foi feita a subtração do Ct do alvo em estudo do Ct da beta actina (ΔCt). Por estes ensaios serem pré-fabricados e validados pela empresa Applied Biosystems, assumiu-se que a eficiência da reação foi de 100%, logo utilizou-se a fórmula $1 + \text{eficiência da reação} - \Delta Ct$ ($2 - \Delta Ct$) para os cálculos de quantificação relativa.

4.2.4.2 Avaliação Histológica Descritiva

A metade restante do músculo masseter foi usada para a análise histológica. O músculo masseter foi inicialmente fixado em formol tamponado. Sequencialmente, as peças foram lavadas em água por 24 h e transferidas para um recipiente contendo álcool 70% e permaneceram nesse local até que as mesmas fossem incluídas em parafina. Na etapa seguinte foram obtidos cortes sucessivos, delgados e uniformes a partir do bloco de parafina com as peças incluídas e então as secções foram coradas por hematoxilina-eosina (HE) e avaliadas em microscópio de luz (microscópio óptico binocular OLYMPUS, modelo CH-2, com objetivas de aumento de até 40x) para o estudo histopatológico descritivo no intuito de verificar alterações no tecido muscular e tecidos adjacentes.

4.2.5. Linha do tempo do estudo

Para uma melhor compreensão do desenho experimental, segue abaixo uma figura contendo o fluxograma das etapas experimentais do estudo.

Figura 1- Fluxograma com a sequência dos experimentos.

4.3. Análise estatística:

Os dados foram apresentados pela média $\pm$ Desvio Padrão. A comparação das respostas comportamentais nociceptivas e da expressão de citocinas entre os grupos foi feita utilizando-se 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 $p < 0,05$. O programa utilizado para a realização dos cálculos estatísticos foi o GraphPad Prism versão 3.0.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Análise de comportamento nociceptivo

No gráfico 1 pode-se observar a resposta comportamental dos animais ao estímulo nociceptivo. Foi verificado um aumento significativo do comportamento nociceptivo nos ratos não diabéticos ou normoglicêmicos submetidos à injeção de SH (Cont-SH, $46,8 \pm 25,63$) em relação aos demais grupos que foram similares entre SI (Cont-SI, $8 \pm 4,57$; Diab-SI, $14,7 \pm 10,73$; Diab-SH, $14,1 \pm 16,30$).

Gráfico 1 – Avaliação da resposta comportamental nociceptiva nos diferentes grupos experimentais. Cada coluna representa a média $\pm$ desvio padrão do comportamento nociceptivo. Letras diferentes expressam diferença significativa (a, b) $p < 0,0001$; ANOVA, seguida do pós-teste de Tukey

5.2 Análise da expressão de citocinas

Nos gráficos de 2 a 7 estão descritos os valores relativos do RNAm para as citocinas pró e anti-inflamatórias em músculo masseter nos diferentes grupos experimentais. Foi verificado que o músculo masseter de ratos não diabéticos submetidos à injeção de SH (Cont-SH, $12,35 \pm 5,04$) apresentaram um aumento significativo da expressão relativa de TNF α (Gráfico 2) em relação aos demais grupos que foram similares entre SI (Cont-SI, $2,52 \pm 1,51$; Diab-SI, $4,20 \pm 2,64$; Diab-

Resultados

SH, $6,00 \pm 2,91$). Também foi verificada um aumento da expressão relativa de IL-1 β (Gráfico 3) nesse mesmo grupo (Cont-SH, $11,35 \pm 10,39$) em relação aos grupos Cont-SI ($0,60 \pm 0,32$) e Diab-SI ($1,21 \pm 0,64$), mas não em relação ao grupo Diab-SH ($2,15 \pm 1,65$). A IL-6 (Gráfico 4) foi significativamente mais expressa no músculo masseter de ratos não diabéticos submetidos à injeção de SH ($335,96 \pm 362,82$) em relação ao grupo Cont-SI ($4,15 \pm 3,07$), mas não foi diferente nos demais grupos (Diab-SI, $7,77 \pm 3,40$; Diab-SH, ($7,98 \pm 5,03$). As demais citocinas avaliadas (COX-2, IL-2 e IL-10) não mostraram diferenças significativas entre os grupos, no entanto no apêndice 1 dessa dissertação estão descritos os valores médios e desvios padrões de todas essas citocinas.

Gráfico 2 – Expressão relativa de RNAm para TNF α nos diferentes grupos experimentais. Cada coluna representa a média $\pm$ desvio padrão da expressão relativa de TNF α .

Letras diferentes expressam diferença significativa (a, b)
 $p=0,0013$; ANOVA, seguida do pós teste de Tukey

Resultados

Gráfico 3 – Expressão relativa de RNA para IL-1 β nos diferentes grupos experimentais. Cada coluna representa a média $\pm$ desvio padrão da expressão relativa de IL-1 β .

Letras diferentes expressam diferença significativa (a, b)
 $p=0,0167$; ANOVA, seguida do pós teste de Tukey

Gráfico 4 - Expressão relativa de RNA para IL-6 nos diferentes grupos experimentais. Cada coluna representa a média $\pm$ desvio padrão da expressão relativa de IL-6.

Letras diferentes expressam diferença significativa (a, b)
 $p=0,0242$; ANOVA, seguida do pós teste de Tukey

Gráfico 5 – Expressão relativa de RNAm para COX-2 nos diferentes grupos experimentais. Cada coluna representa a média $\pm$ desvio padrão da expressão relativa de COX-2. Letras iguais expressam ausência de diferença significativa (a, a) $p=0,1212$; ANOVA

Gráfico 6 - Expressão relativa de RNAm para IL-2 nos diferentes grupos experimentais. Cada coluna representa a média $\pm$ desvio padrão da expressão relativa de IL-2. Letras diferentes expressam diferença significativa (a, b) $p=0,4512$; ANOVA, seguida do pós teste de Tukey

Gráfico 7 - Expressão relativa de RNAm para IL-10 nos diferentes grupos experimentais. Cada coluna representa a média $\pm$ desvio padrão da expressão relativa de IL-10.

Letras diferentes expressam diferença significativa (a, b)
 $p=0,3360$; ANOVA, seguida do pós teste de Tukey

5.3 Análise histológica

Na análise histopatológica das lâminas coradas com HE realizada por meio de microscopia óptica, não foram identificadas alterações no tecido muscular, apenas a presença de discreto infiltrado inflamatório e áreas sugestivas de edema discreto associado aos focos de células inflamatórias, especialmente no grupo de animais normoglicêmicos que receberam a injeção intramuscular de salina hipertônica.

Figura 2- Fotomicrografia do músculo masseter de ratos em diferentes condições experimentais (Cont-SI: A e B; Cont-SH: C e D; Diab-SI: E e F; Diab-SH: G e H), HE, aumento de 10x e 40x

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

O objetivo do presente estudo foi verificar o perfil nociceptivo orofacial, a expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias e os parâmetros histológicos em ratos diabéticos induzidos por STZ, um dos principais agentes químicos indutores de diabetes experimental em roedores. Os principais achados foram: 1) ratos não diabéticos ou normoglicêmicos submetidos à injeção intramuscular de salina hipertônica (Cont-SH) apresentaram um comportamento nociceptivo significativamente maior que todos os demais grupos experimentais, os quais foram similares entre si do ponto de vista de nocicepção; 2) a expressão de TNF α foi significativamente maior nos ratos normoglicêmicos submetidos ao estímulo nociceptivo SH (Cont-SH) em relação àqueles não diabéticos ou hiperglicêmicos sob o mesmo estímulo; 3) a análise histológica mostrou discreto infiltrado inflamatório nos ratos não diabéticos ou normoglicêmicos submetidos à injeção intramuscular de salina hipertônica (Cont-SH).

O modelo de diabetes induzido experimentalmente pela administração intraperitoneal de STZ é comumente utilizado para avaliação das alterações nociceptivas induzidas pela diabetes (CUNHA et al., 2009; NONES et al., 2013; XIE et al., 2015). A STZ tem como efeito, a destruição das células beta-pancreáticas e consequentemente uma deficiência na produção de insulina (CARVALHO; CARVALHO; FERREIRA, 2003).

Da mesma forma, a SH tem sido utilizada para a indução de dor muscular experimental tanto em estudos com animais quanto com humanos (RO et al., 2007; LOUCA et al., 2014) sendo considerado um método adequado para o estudo da dor muscular na região orofacial (SVENSSON; LIST; HECTOR, 2001). Embora o mecanismo exato pelo qual a SH induz dor muscular não seja totalmente esclarecido, tem sido sugerido aumento da ativação de fibras aferentes nociceptivas (GRAVEN-NIELSEN; MENSE, 2001), a ativação de neurônios no SNC que codificam informação nociceptiva (SVENSSON; GRAVEN-NIELSEN, 2001). Verificou-se também que a injeção intramuscular de SH em músculo masseter ativa um grupo de neurônios trigeminais no SNC que processam as informações provenientes de fibras aferentes musculares de pequeno diâmetro e de alto limiar de excitação que

respondem a estímulos nociceptivos (RO; CAPRA, 1999) e produz respostas comportamentais nociceptivas estereotipadas (RO; CAPRA; MASRI, 2003), que podem ser mensuradas. A ação da SH também tem sido associada ao aumento de alguns biomarcadores de dor muscular, como serotonina e glutamato (RO et al., 2007; LOUCA et al., 2014).

Com relação à nocicepção, no presente estudo foi demonstrado que a SH produziu um aumento da resposta nociceptiva nos ratos não diabéticos, o que não ocorreu no grupo diabético. Assim, a nocicepção foi influenciada pela presença do agente álgico (SH) e ausência de diabetes experimental. Nessa direção, a nossa pesquisa indica uma hiposensibilidade ou resposta nociceptiva reduzida dos animais diabéticos ao estímulo álgico SH.

De maneira geral, encontra-se na literatura que a indução experimental de diabetes em roedores com STZ induz hipernocicepção térmica, mecânica e química na pata (CUNHA et al., 2009; BISHNOI et al., 2011; HASANEIN, 2011) e hipernocicepção térmica na região orofacial (RODELLA et al., 2000; NONES et al., 2013; XIE et al., 2015). Embora Nones et al. (2013) tenha verificado uma hipernocicepção térmica orofacial em ratos diabéticos, nenhuma hipernocicepção química ou mecânica foi observada. Em outra direção, uma pesquisa recente indicou uma hiponocicepção na ATM de ratos diabéticos em diferentes tempos, incluindo o 14º dia após a indução da diabetes experimental com STZ, resultado esse que corrobora nossos achados (MUZILLI JUNIOR, 2014). Da mesma forma, foi observado que pacientes diabéticos apresentaram maior limiar de dor em áreas inervadas pelo nervo trigêmeo e que essa diminuição da sensibilidade dolorosa foi associada com maior nível glicêmico e de hemoglobina glicada (ARAP et al., 2010).

Nesse ponto vale destacar alguns aspectos que devem ser levados em consideração sobre as diferenças encontradas entre os diferentes estudos: 1) os estudos têm se utilizado de diferentes metodologias para investigar a nocicepção, desde testes que avaliam o limiar nociceptivo por meio de estímulos térmicos e mecânicos e também através de estímulos químicos que induzem uma resposta comportamental nociceptiva que é quantificada; 2) a influência da diabetes experimental induzido por STZ na nocicepção tem sido investigada em diferentes estruturas anatômicas (pata, lábio, ATM e músculo) e estudos mostram diferenças no processamento da informação nociceptiva em áreas inervadas por nervos

espinhais e trigeminais (SESSLE, 2005; SÁNCHEZ et al., 2010); 3) os testes que avaliam a nocicepção têm sido realizados em diferentes profundidades teciduais (tecidos cutâneo, subcutâneo e profundo); 4) as mensurações da resposta nociceptiva têm sido realizadas em diferentes tempos após a indução da diabetes experimental, ou seja, os animais podem apresentar diabetes em fases mais iniciais, intermediárias e mais tardias o que pode modificar o padrão de resposta nociceptiva.

Assim, apesar das diferenças metodológicas apresentadas, fica evidente que a indução de diabetes é associada à uma alteração do processamento da informação nociceptiva, possivelmente envolvendo diferentes etapas que constituem esse processo, e.g., alteração da transdução, da transmissão e da modulação da dor. Entretanto, a direção dessas modificações, i.e., ganho ou perda de função nociceptiva, ainda não está totalmente elucidado, embora a maioria dos estudos demonstre uma diminuição do limiar nociceptivo (hipersensibilidade ou hipernocicepção). Estudos sistemáticos envolvendo diferentes modelos de avaliação da dor em diferentes profundidades de tecido e em diferentes tempos após a indução da diabetes experimental são necessários para um correto preenchimento dessas lacunas de conhecimento.

No presente estudo, também foi investigado a expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias no músculo masseter 1 hora após a indução da nocicepção pela SH e 14 dias após a indução da diabetes experimental. Foi verificado que o TNF α aumentou de forma significativa apenas no grupo de ratos não diabéticos submetidos à injeção intramuscular de SH. Da mesma forma, as citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-6 tenderam a aumentar nesse mesmo grupo, embora nenhuma diferença significativa tenha sido observada em relação ao grupo de animais diabéticos submetidos à injeção intramuscular de SH. Essas citocinas pró-inflamatórias são produzidas predominantemente por macrófagos ativados e estão envolvidas no aumento das reações inflamatórias, bem como em quadros de dor patológica (ZHANG; AN, 2007).

Uma vez que soluções hipertônicas possam levar a uma inflamação neurogênica (DEL BIANCO et al., 1991; BARANIUK et al., 1999), uma hipótese para o aumento dessas citocinas é que a hipernocicepção química ocorrida nos ratos normoglicêmicos e não nos diabéticos possa ter gerado um quadro de inflamação

neurogênica. Nesse sentido, o aumento das informações nociceptivas de entrada no subnúcleo caudal no trato espinhal do trigêmeo no tronco encefálico pode ter levado a uma resposta dos aferentes primários nociceptivos de liberação antidrômica de neuropeptídeos como a substância P (SP) e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP, sigla em inglês) na periferia, mais especificamente no local do estímulo nociceptivo, o músculo masseter. Essa liberação de SP e CGRP associada ao aumento dos níveis de glutamato e serotonina que tem sido observado no músculo masseter de ratos submetidos à injeção intramuscular de SH (RO et al., 2007; LOUCA et al., 2014) podem ter ativado células residentes, especialmente macrófagos residentes, o que gerou o aumento da expressão das citocinas pró-inflamatórias no masseter de ratos normoglicêmicos submetidos à injeção de SH e não nos ratos diabéticos. Nessa direção, um estudo indicou uma diminuição dos níveis de SP e CGRP no tecido gengival e de glutamato no gânglio trigeminal de ratos sob movimentação ortodôntica e com diabetes experimental induzido por STZ, efeitos esses que também vão a favor dos nossos achados, uma vez que tais mediadores têm um papel importante na transmissão da informação nociceptiva (FREITAS, 2014).

Aqui vale enfatizar que tem sido verificada um aumento de mediadores inflamatórios no músculo esquelético de ratos diabéticos (SHAMSI et al., 2014), o que, como supracitado não ocorreu no presente estudo. No entanto, uma limitação desse estudo foi ter quantificado a expressão das citocinas pró e anti-inflamatórias em um único momento, 14 dias após a indução da diabetes e uma hora após o estímulo nociceptivo com salina hipertônica. Assim, a mensuração desses parâmetros em diferentes momentos poderia nos trazer uma melhor compreensão do comportamento dessas citocinas ao longo do tempo, com e sem o desafio nociceptivo usando a SH.

Por fim, a análise histológica revelou um discreto infiltrado inflamatório, especialmente nos animais normoglicêmicos submetidos à injeção intramuscular de SH, no entanto, não foi identificadas alterações significativas no tecido muscular entre os grupos experimentais.

Esse estudo teve algumas restrições: não foi verificado o perfil nociceptivo nem a expressão de citocinas em diferentes momentos, portanto estudos futuros devem ser realizados no sentido de avaliar se esse comportamento é tempo

dependente; ainda houve uma grande variabilidade no padrão de expressão das citocinas, o que indica que os resultados desse parâmetro devem ser interpretados com cautela.

Em suma, esses resultados sugerem que os ratos diabéticos são hiporresponsivos ao estímulo nociceptivo nas condições metodológicas propostas no presente estudo. Há de se considerar o tipo de estímulo que aqui foi utilizado, a SH, uma vez que a mesma causa uma dor de curta duração e não inflamatória, mimetizando uma dor muscular típica.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos, podemos concluir que os ratos diabéticos apresentaram:

- um reduzido comportamento nociceptivo, o que indica um estado de hiponocicepção química;
- uma reduzida expressão de algumas citocinas pró-inflamatórias;
- menor infiltrado inflamatório em relação aos ratos normoglicêmicos.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

AGRAWAL, Y. O. et al. Hesperidin produces cardioprotective activity via PPAR- γ pathway in ischemic heart disease model in diabetic rats. **PLoS One**, v. 4, n. 9, p.11, 2014.

AKHTER, R. et al. Experimental jaw muscle pain increases pain scores and jaw movement variability in higher pain catastrophizers. **J Oral Facial Pain Headache**, v. 28, n. 3, p. 191-204, 2014.

ALI, H. et al. Mechanisms of inflammation and leucocyte activation. **Med Clin North America**, v. 81, n. 1, p. 1-28, 1998.

ALI, S. et al. Streptozotocin induced diabetes: mechanisms of induction. **International J Pharm Res and Dev**, v. 4, n. 04, p. 11-5, 2012.

ALI, Y. et al. Design, synthesis and biological evaluation of piperic acid triazolyl derivatives as potent anti-inflammatory agents. **Eur J Med Chem**, v. 92, p. 490-500, 2015.

ARAP, A. et al. Trigeminal pain and quantitative sensory testing in painful peripheral diabetic neuropathy. **Arch Oral Biol**, v. 55, n. 7, p. 486-93, 2010.

AREZZO, J. C.; ZOTOVA, E. Electrophysiologic measures of diabetic neuropathy: mechanism and meaning. **Int Rev Neurobiol**, v. 50, p. 229-255, 2002.

BARANIUK, J. N. et al. Hypertonic saline nasal provocation stimulates nociceptive nerves, substance P release, and glandular mucous exocytosis in normal humans. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 160, n. 2, p. 655-62, 1999.

BENDIXEN, K. H. et al. Effect of propranolol on hypertonic saline-evoked masseter muscle pain and autonomic response in healthy women during rest and mental arithmetic task. **J Orofac Pain**, v. 27, n. 3, p. 243-255, 2013.

BINGHAM, C. O. The pathogenesis of rheumatoid arthritis: pivotal cytokines involved in bone degradation and inflammation. **J Reum**, v. 29, n. 65, p. 65:3-9, 2002.

BISHNOI, M. et al. Streptozotocin-induced early thermal hyperalgesia is independent of glycemic state of rats: role of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) and inflammatory mediators. **Mol Pain**, v. 27, n. 7, p. 52, 2011.

BOSI, P. L. et al. Prevalência de diabetes mellitus e tolerância à glicose diminuída na população urbana de 30 a 79 anos da cidade de São Carlos, São Paulo. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 53, n. 6, p. 726-32, 2009.

CAIRNS, B. E. et al. Diclofenac exerts local anesthetic-like actions on rat masseter muscle afferent fibers. **Brain Research**, v. 1194, p. 56-64, 2008.

CARDOSO, R. J. A.; GONÇALVES, E. A. N. 20ª Arte Ciência Técnica, Artes Médicas: São Paulo; 2002.

CARVALHO, E. N.; CARVALHO, N. A. S.; FERREIRA, L. M. Experimental model of induction of diabetes mellitus in rats. **Acta Cir Bras**, v. 18, n. SPE, p. 60-64, 2003.

CHRISTOPH, T. et al. Tapentadol, but not morphine, selectively inhibits disease-related thermal hyperalgesia in a mouse model of diabetic neuropathic pain. **Neurosci Lett**, v. 470, p. 91-4, 2010.

CLAVELOU, P. et al. Application of the formalin test to the study of orofacial pain in the rat. **Neurosci Lett**, v. 103, n. 3, p. 349-53, 1989.

CORREIA-SANTOS, A. M. et al. Indução de Diabetes Tipo 2 por dieta hiperlipídica e baixa dose de estreptozotocina em ratas wistar. Medicina. **Ribeirão Preto Online**, v. 45, n. 4, p. 436-444, 2012.

CREANGE, A.; BARLOVATZ-MEIMON, G.; GHERARDI, R. K. Cytokines and peripheral nerve disorders. **Eur Cytokine Netw**, v. 8, p. 145–151, 1997.

CUNHA, F. Q. et al. The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. **Br J Pharmacol**, v. 107, p. 660–664, 1992.

CUNHA, J. M. et al. Streptozotocin-induced mechanical hypernociception is not dependent on hyperglycemia. **Braz J Med Biol Res**, v. 42, n. 2, p. 197- 206, 2009.

DAVIDSON, E. P. et al. Effect of inhibition of angiotensin converting enzyme and/or neutral endopeptidase on vascular and neural complications in high fat fed/low dose streptozotocin-diabetic rats. **Eur J Pharmacol**, v. 677, p. 180-7, 2012.

DE OLIVEIRA, C. M. B. et al. Citocinas e Dor. **Rev Bras Anesthesiol**, v. 61, n. 2, p. 255-265, 2011.

DEL BIANCO, E. et al. Release of sensory CGRP by hypertonic NaCl is not blocked by tetrodotoxin, omega-conotoxin, nifedipine and ruthenium red. **Life Sci**, v. 51, n. 8, p. PL73-6, 1992.

DELEO, J. A. et al. Interleukin-6-mediated hyperalgesia/allodynia and increased spinal IL-6 expression in a rat mononeuropathy model. **J Interferon Cytokine Res**, v. 16, p. 695–700, 1996.

DIAS, J. C. R; CAMPOS, J. A. D. B. Diabetes mellitus: razão de prevalências nas diferentes regiões geográficas no Brasil, 2002-2007. **Cien Saude Colet**, v. 17, n. 1, p. 239-244, 2012.

DONAHUE, R. P.; TIEJIAN, W. U. Insulin resistance and periodontal disease: an epidemiologic overview of research needs and future directions. **Ann Periodontol**, v. 6, n. 1, p. 119-124, 2001.

FREITAS, F. F. **Avaliação do efeito da movimentação ortodôntica no desenvolvimento de neuropatia decorrente do diabetes induzido em ratos.** Piracicaba: Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, 2014. [S.N.]. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Universidade de Campinas, 2014.

GRAVEN-NIELSEN, T.; MENSE, S. The peripheral apparatus of muscle pain: evidence from animal and human studies. **Clin J Pain**, v. 17, n. 1, p. 2-10, 2001.

HASANEIN, P. Effects of histamine H3 receptors on chemical hyperalgesia in diabetic rats. **Neuropharmacology**, v. 60, n. 6, p. 886-91, 2011.

HASSANEIN, M. et al. Comparison of the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor vildagliptin and the sulphonylurea gliclazide in combination with metformin, in Muslim patients with type 2 diabetes mellitus fasting during Ramadan: results of the VECTOR study. **Curr Med Res Opin**, v. 27, n. 7, p. 1367-1374, 2011.

HOWARD, R. F.; WIENER, S.; WALKER, S. M. Neuropathic pain in children. **Arch Dis Child**, v. 99, p. 84–89, 2014.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **Diabetes Atlas**. Disponível em: <<http://www.idf.org/diabetesatlas>>. Acesso em 10/03/2015.

JEANJEAN, A. P. et al. Interleukin-1 beta induces long-term increase of axonally transported opiate receptors and substance P. **Neurosci J**, v. 68, p. 151–157, 1995.

JIN, X.; GEREAU, R. W. Acute p38-mediated modulation of tetrodotoxin-resistant sodium channels in mouse sensory neurons by tumor necrosis factor- α . **Neurosci J**, v. 26, n. 1, p. 246-255, 2006.

KHAN, A. A. et al. Tumor necrosis factor alpha enhances the sensitivity of rat trigeminal neurons to capsaicin. **Neurosci J**, v. 155, n. 2, p. 503–509, 2008.

KLEIN, M. A. et al. Impaired neuroglial activation in interleukin-6 deficient mice. **Glia**, v. 19, p. 227–233, 1997.

KODAIRA, M.; INUI, K.; KAKIGI, R. Evaluation of nociceptive Ad- and Cfiber dysfunction with lidocaine using intraepidermal electrical stimulation. **Clin Neurophysiol**, v. 125, p. 1870–1877, 2014.

KRAYCHETE, D. C.; CALASANS, M. T. A.; VALENTE, C. M. L. Citocinas pró-inflamatórias e dor. **Rev. bras. reumatol**, v. 46, n. 3, p. 199-206, 2006.

KUKIDOME, D. et al. Measurement of small fibre pain threshold values for the early detection of diabetic polyneuropathy. **Diabet Med**, v. 33, n. 1, p. 62-69, 2016.

LEITE, A. L. et al. Proteomic analysis of gastrocnemius muscle in rats with streptozotocin-induced diabetes and chronically exposed to fluoride. **PloS one**, v. 9, n. 9, p. e106646, 2014.

LEITE, M. F. et al. Diabetes induces metabolic alterations in dental pulp. **J Endod**, v. 34, p. 1211-4, 2008.

LIMA, S. M. F. et al. Diabetes mellitus and inflammatory pulpal and periapical disease: a review. **J Br Endod Soc**, v. 46, n. 8, p. 700-709, 2013.

LINS, R. D. A. U. et al. As citocinas e o periodonto: o papel dos fatores de crescimento na saúde periodontal. **Int J Dent**, v. 9, n. 1, p. 38-43, 2010.

LOE, H. Periodontal disease. The sixth complication of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v.16, n.1, p.329-34, 1993.

LOUCA, S. et al. Serotonin, glutamate and glycerol are released after the injection of hypertonic saline into human masseter muscles - a microdialysis study. **J Headache Pain**, v. 15, n. 1, p. 1-11, 2014.

MACHADO, P. R.L. et al. Immune response mechanisms to infections. **An Bras Dermatol**, v. 79, n. 6, p. 647-662, 2004.

MALERBI D.; FRANCO L. J. The Brazilian Cooperative Group on the Study of Diabetes Prevalence. Multicenter study of the prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban Brazilian population aged 30 a 69 years. **Diabetes Care**, v.15, n.11, p.1509-16, 1992.

MCKELVEY, R. et al. Neuropathic pain is constitutively suppressed in early life by anti-inflammatory neuroimmune regulation. **Neurosci J**, v. 35, n. 2, p. 457-466, 2015.

MEALEY, B. L. Influence of periodontal infections on systemic health. **Periodontol 2000**, v. 21, n. 1, p. 197-209, 1999.

MEALEY, B. L.; OATES, T. W. Diabetes mellitus and periodontal diseases. **J Periodontol**, v. 77, n. 8, p. 1289-1303, 2006.

MENG, X. et al. Spinal interleukin-17 promotes thermal hyperalgesia and NMDA NR1 phosphorylation in an inflammatory pain rat model. **Pain**, v. 154, n. 2, p. 294-305, 2013.

MORAES, A. S. et al. Prevalência de diabetes mellitus e identificação de fatores associados em adultos residentes em área urbana de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil 2006: Projeto OBEDIARP. **Cad Saude Publica**, v.26, n.5, p.929-41, 2010.

Muzilli Junior, A. **Avaliação do desenvolvimento de neuropatia diabética na ATM de ratos e a relação da expressão das isoformas da proteinoquinase C (PKC) neste processo**. Piracicaba: Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, 2014. [S.N.]. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Universidade de Campinas, 2014.

NGUYEN, H. T. T. et al. Enhanced GABA action on the substantia gelatinosa neurons of the medullary dorsal horn in the offspring of streptozotocin-injected mice. **J Diabet Complications**, v. 29, n. 5, p. 629-636, 2015.

NOLAN, C. J. et al. Type 2 diabetes across generations: from pathophysiology to prevention and management. **Lancet**, v.378, n.9786, p.169-81, 2011.

NONES, C. F. et al. Orofacial sensory changes after streptozotocin-induced diabetes in rats. **Brain Res**, v. 1501, p. 56-67, 2013.

OLIVEIRA, R. Nepomuceno de et al. Doença periodontal em pacientes com Diabetes Mellitus: influência de polimorfismos genéticos? **Rev Odontol UNESP**, p. 187-194, 2011.

PABREJA, K. et al. Minocycline attenuates the development of diabetic neuropathic pain: possible anti-inflammatory and anti-oxidant mechanisms. **Eur J Pharmacol**, v. 66, n. 1, p. 15-21, 2011.

PIHUT, M. et al. Differential Diagnostics of Pain in the Course of Trigeminal Neuralgia and Temporomandibular Joint Dysfunction. **Biomed Res Int**, v. 2014, 2014.

POOLE, S. et al. Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-10. **Br. J. Pharmacol**, v. 115, n. 4, p. 684-688, 1995.

PORPORATTI, A. L. et al. Acupuncture therapeutic protocols for the management of temporomandibular disorders. **Revista Dor**, v. 16, n. 1, p. 53-59, 2015.

RAHIM-WILLIAMS, B. et al. Influences of adult-onset diabetes on orofacial pain and related health behaviors. **J Public Health Dent**, v. 70, p. 2, p. 85–92, 2010.

REICHLING, D. B.; GREEN, P. G.; LEVINE, J. D. The fundamental unit of pain is the cell. **Pain**, v. 154, p. S2-S9, 2013.

RO, J. Y. Bite force measurement in awake rats: a behavioral model for persistent orofacial muscle pain and hyperalgesia. **J Orofac Pain**, v. 19, n. 2, p. 159-167, 2005

RO, J. Y.; CAPRA, N. F.; MASRI, R. Development of a behavioral assessment of craniofacial muscle pain in lightly anesthetized rats. **Pain**, v. 104, n. 1, p. 179-185, 2003.

RO, J. Y.; CAPRA, N. F.; LEE, J. S.; MASRI, R.; CHUN, Y. H. Hypertonic saline-induced muscle nociception and c-fos activation are partially mediated by peripheral NMDA receptors. **Eur J Pain**, v. 11, n. 4, p. 398-405, 2007.

RO, J. Y.; CAPRA, N. F. Evidence for subnucleus interpolaris in craniofacial muscle pain mechanisms demonstrated by intramuscular injections with hypertonic saline. **Brain Res**, v. 842, n. 1, p. 166-183, 1999.

RO, J. Y.; CAPRA, N. F. Evidence for subnucleus interpolaris in craniofacial muscle pain mechanisms demonstrated by intramuscular injections with hypertonic saline. **Brain Res**, v. 842, n. 1, p. 166-183, 1999.

RO, J. Y.; CAPRA, N. F.; MASRI, R. Development of a behavioral assessment of craniofacial muscle pain in lightly anesthetized rats. **Pain**, v. 104, n. 1, p. 179-185, 2003.

RODELLA, L.; REZZANI, R.; CORSETTI, G.; BIANCHI, R. Nitric oxide involvement in the trigeminal hyperalgesia in diabetic rats. **Brain Res**, v. 865, n. 1, p. 112-115, 2000.

ROVERONI, R. C. et al. Development of a behavioral model of TMJ pain in rats: the TMJ formalin test. **Pain**, v. 94, n. 2, p. 185-191, 2001.

SALGADO, P. **Prevalência e fatores associados à nefropatia diabética em pacientes com diabetes mellitus tipo 1**. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

SÁNCHEZ, E. M.; BAGÜES, A.; MARTÍN, M. I. Contributions of peripheral and central opioid receptors to antinociception in rat muscle pain models. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 96, n. 4, p. 488-495, 2010.

SÁNCHEZ, R. E. M. et al. Cannabinoids and muscular pain. Effectiveness of the local administration in rat. **Eur J Pain**, v. 16, n. 8, p. 1116-1127, 2012.

SCHWEIZER, A. et al. Interleukin-1 enhances pain reflexes. Mediation through increased prostaglandin E2 levels. **Agents Actions**, v. 25, p. 246-251, 1988.

SESSLE, B. J. Peripheral and central mechanisms of orofacial pain and their clinical correlates. **Minerva Anesthesiol**, v. 71, p. 117-36, 2005.

SHAMSI, M. M. et al. Expression of interleukin-15 and inflammatory cytokines in skeletal muscles of STZ-induced diabetic rats: effect of resistance exercise training. **Endocrine**, v. 46, n. 1, p. 60-69, 2014.

SILVA, M. F. et al. Prevalence of oral mucosal lesions among patients with diabetes mellitus types 1 and 2. **An Bras Dermatol**, v. 90, n. 1, p. 49-53, 2015.

SIMA, A. A.; SUGIMOTO, K. Experimental diabetic neuropathy: an update. **Diabetologia**, v. 42, n. 7, p. 773-88, 1999.

SIMONIC-KOCIJAN, S. et al. TRPV1 channel mediated bilateral allodynia induced by unilateral masseter muscle inflammation in rats. **Molecular Pain**, v. 9, n. 1, p. 68, 2013.

SINGH, R.; KISHORE, L.; KAUR, N. Diabetic peripheral neuropathy: current perspective and future directions. **Pharmacol Res**, v. 80, p. 21-35, 2014.

SUN, W. et al. Gastrodin inhibits allodynia and hyperalgesia in painful diabetic neuropathy rats by decreasing excitability of nociceptive primary sensory neurons. **Plos One**, v. 7, n. 6, 2012.

SVENSSON, P.; GRAVEN-NIELSEN, T. Craniofacial muscle pain: review of mechanisms and clinical manifestations. **J Orofac Pain**, v. 15, n. 2, p. 117-45, 2001.

SVENSSON, P.; LIST, T.; HECTOR, G. Analysis of stimulus-evoked pain in patients with myofascial temporomandibular pain disorders. **Pain**, v. 92, n. 3, p. 399-409, 2001.

TARIQ, S. et al. Diabetes-induced changes in the morphology and nociceptinergic innervation of the rat uterus. **J Mol Histol**, v. 47, n. 1, p. 21-33, 2016.

TESFAYE, S.; SELVARAJAH, D. Advances in the epidemiology, Pathogenesis and management of diabetic peripheral neuropathy. **Diabetes Metab Res Rev**, v. 28, n. 1, p. 8-14, 2012.

TROGER, J. et al. The effect of streptozotocin-induced diabetes mellitus on substance P and calcitonin gene-related peptide expression in the rat trigeminal ganglion. **Brain Research**, v. 842, p. 84-91, 1999.

VERNILLO, A. T. Diabetes mellitus: relevance to dental treatment. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Endod**, v. 91, n. 3, p. 263-270, 2001.

WATKINS, L. R. et al. Characterization of cytokine-induced hyperalgesia. **Brain Res**, v. 654, p. 15–26, 1994.

WOOLF, C. J. et al. Cytokines, nerve growth factor and inflammatory hyperalgesia: the contribution of tumour necrosis factor alpha. **Br J Pharmacol**, v. 121, p. 417–424, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Health Topics - Diabetes**. Disponível em: <http://www.who.int/topics/diabetes_mellitus/en/> Acesso em: 10/03/2015.

XIE, H. Y. et al. Increases in PKC gamma expression in trigeminal spinal nucleus is associated with orofacial thermal hyperalgesia in streptozotocin-induced diabetic mice. **J Chem Neuroanat**, v. 63, p. 13-9, 2015.

YAMAMOTO, H. et al. Pharmacological characterization of Standard analgesics on mechanical allodynia in streptozotocin – induced diabetic rats. **Neuropharmacology**, v. 57, n. 4, p. 403–8, 2009.

YOU, H. J. et al. Specific thalamic nuclei function as novel ‘nociceptive discriminators’ in the endogenous control of nociception in rats. **Neurosci J**, v. 232, p. 53-63, 2013.

YOUSEFZADEH, N.; ALIPOUR, M. R.; SOUFI, F. G. Deregulation of NF-κB–miR-146a negative feedback loop may be involved in the pathogenesis of diabetic neuropathy. **J Physiol Biochem**, v. 71, n. 1, p. 51-58, 2015.

ZHANG, J. M.; AN, J. Cytokines, inflammation, and pain. **Int Anesthesiol Clin**, v. 45, p. 27-37, 2007.

ZHAO, Y. J. et al. Involvement of trigeminal astrocyte activation in masseter hyperalgesia under stress. **Physiol behav**, v. 142, p. 57-65, 2015.

ZIEGLER, D. Painful diabetic neuropathy: treatment and future aspects. **Diabetes Metab Res Rev**, v. 24, n. S1, p. 52-57, 2008.

ZIMMERMANN, M. Ethical guide lines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v. 16, n. 2, p. 109-110, 1983.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Média e desvio padrão (dp) dos valores do comportamento e das citocinas avaliadas.

GRUPOS	COX-2		TNF α		IL-1 β		IL-6		IL-2		IL-10		Nocicepção	
	Média	dp	Média	dp	Média	dp	Média	dp	Média	dp	Média	dp	Média	dp
Cont-SI	4,62	2,54	2,52	1,51	0,60	0,32	4,15	3,07	1,87	0,41	1,76	0,58	8	4,57
Cont-SH	15,57	16,43	12,35	5,04	11,35	10,39	335,96	362,82	2,97	1,86	3,11	2,52	46,8	25,63
Diab-SI	4,15	2,21	4,20	2,64	1,21	0,64	7,77	3,40	4,06	3,29	1,55	0,53	14,7	10,73
Diab-SH	3,93	2,13	6,00	2,91	2,15	1,65	7,98	5,03	2,73	1,74	3,42	2,77	14,1	16,30

ANEXOS

ANEXO A – Carta de aprovação da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais da FOB – USP.

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru
Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em
Animais

CEEPA-Proc. N° 005/2015

Bauru, 22 de junho de 2015

Senhor Professor,

Informamos que o projeto de pesquisa intitulado “Perfil nociceptivo orofacial em ratos diabéticos” sob a responsabilidade de Vossa Senhoria, que envolve a utilização de roedores, para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado ad referendum pela Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais (CEEPA).

Esta comissão solicita que ao final da pesquisa seja enviado relatório com os resultados obtidos para análise ética e emissão de parecer final, o qual poderá ser utilizado para fins de publicação científica.

Vigência do projeto	Agosto/2015 a Dezembro/2015
Espécie/Linhagem	<i>Rattus norvegicus</i> , Wistar
Nº de animais	n=70
Peso/idade	60dias/200g
Sexo	Macho
Origem	Biotério de criação da FOB/USP

Cordialmente,

Profª Drª Ana Paula Campanelli
Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Prof. Dr. Flávio Augusto Cardoso de Faria
Docente do Departamento de Ciências Biológicas