Bruna Luiza Roim Varotto

**Avaliação da sensibilidade mecânica, ansiedade e neuroplasticidade
cortical motora em ratos submetidos à doença periodontal experimental**

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para a
obtenção do título de Mestre em
Ciências

Programa de Neurologia
Orientador: Prof. Dr. José Tadeu
Tesseroli de Siqueira

**São Paulo
2017**

Bruna Luiza Roim Varotto

**Avaliação da sensibilidade mecânica, ansiedade e neuroplasticidade
cortical motora em ratos submetidos à doença periodontal experimental**

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para a
obtenção do título de Mestre em
Ciências

Programa de Neurologia
Orientador: Prof. Dr. José Tadeu
Tesseroli de Siqueira

**São Paulo
2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Varotto, Bruna Luiza Roim

Avaliação da sensibilidade mecânica ansiedade e neuroplasticidade cortical motora em ratos submetidos à doença periodontal experimental / Bruna Luiza Roim Varotto. -- São Paulo, 2017.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Neurologia.

Orientador: José Tadeu Tesseroli de Siqueira.

Descritores: 1.Modelos animais 2.Doenças periodontais 3.Dor
4.Nociceptividade 5.Ansiedade 6.Córtex motor 7.Mapemento encefálico

USP/FM/DBD-044/17

AGRADECIMENTOS

À minha família, Sebastião E C Varotto, Antonia C R C Varotto, Bianca T R Varotto e Bernardo R Varotto, pelo constante exemplo de superação e por estarem ao meu lado desde o início.

Ao meu orientador, Professor Dr José Tadeu Tesseroli de Siqueira, por ter colaborado tanto não apenas neste trabalho, mas também na minha formação profissional e pessoal. Minha admiração transcende estas palavras.

Aos meus amigos da pós-graduação, Ricardo Galhardoni, Mariana Yumi T Puerta e Samanta Pereira; e amigos do Programa de Aprimoramento Profissional, pelos cafés, momentos de incentivo e distração.

À Equipe Odontológica do IPq, incluindo Dra Carolina Andrade e Solange Lopes; Dra Rita sempre acolhedora e especialmente ao Dr Reynaldo Antequera, pela ajuda neste estudo, paciência e generosidade em compartilhar oportunidades.

Aos Professores Gisele M C Fabri, Camila S Dale e Erich T Fonoff pelas considerações importantes que com certeza ajudaram a engrandecer este trabalho.

À Dra Raquel Chacon Ruiz Martinez e Professor Gerson Ballester por todos os conhecimentos compartilhados e paciência em realizar o meu treinamento prévio.

À Professora Monica Andersen, juntamente com sua equipe, por ter me acolhido em seu laboratório para meu treinamento durante o projeto piloto.

À Equipe de Dor Orofacial, dentre eles Professoras Silvia Siqueira e Cynthia Savioli, muito importantes no meu caminho sobre entender os pacientes e suas dores.

Ao estatístico Eriton Santos pelo auxílio na análise dos dados.

À equipe do LIM 26, especialmente ao Professor José Pinhata Otoch, Sra Junko Takano Osaka e ao técnico Sr Elias Marcelino por viabilizar a execução da parte experimental deste estudo.

Ao Departamento de Neurologia, e seus funcionários sempre solícitos.

Ao Diego G Moret, pelo carinho, conversas inspiradoras e dose extra de ânimo na reta final deste trabalho.

“Truth... is much too complicated to allow anything but approximations”

John von Neumann, 1947

“All models are wrong, but some are useful”

George Box, 1976

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journal Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

Lista de tabelas

Lista de gráficos

Lista de figuras

Resumo

Summary

1 INTRODUÇÃO	01
2 OBJETIVOS	03
3 REVISÃO DE LITERATURA	04
3.1 Dor orofacial	05
3.2 Doença periodontal	10
3.3 Dor devido à Doença Periodontal	13
3.4 Doença periodontal experimental	16
3.5 Avaliação experimental da sensibilidade mecânica das vibrissas	
em ratos	17
3.6 Avaliação experimental do comportamento de ansiedade em ratos	18
3.7 Topografia do córtex cerebral	22
3.8 Representação orofacial no córtex cerebral e resposta motora	
mandibular	23
4 MÉTODOS	30
4.1 Animais	30
4.2 Indução da Doença periodontal	31
4.3 Teste de sensibilidade mecânica	33
4.4 Avaliação do comportamento de ansiedade	35
4.5 Mapeamento do córtex motor de vibrissas e mandíbula	38
4.6 Eutanásia	41
4.7 Análise dos dados	41
5 RESULTADOS	43
5.1 Doença Periodontal	44
5.2 Sensibilidade mecânica facial no coxim das vibrissas	45
5.3 Comportamento de ansiedade	46
5.4 Mapeamento cortical motor de vibrissas e mandíbula	51
6 DISCUSSÃO	60

6.1	Indução da Doença periodontal	60
6.2	Sensibilidade mecânica facial no coxim das vibrissas	61
6.3	Comportamento de ansiedade	62
6.4	Mapeamento cortical motor de vibrissas e mandíbula	65
6.5	Considerações finais	69
7	CONCLUSÕES	71
8	REFERÊNCIAS	72
	APÊNDICES	

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

%	Porcentagem
+	Mais
±	Mais ou menos
<	Menor que
®	Marca registrada
°C	grau Celsius
β	beta
δ	delta
cm ²	centímetro quadrado
g	grama
mm	milímetro
μm	micrômetro
mN	micro Newton
n	Número
N	Newton
p	probabilidade
V	Volt
ANOVA	Análise de variância
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
DP	Doença Periodontal
DVO	Dimensão vertical de oclusão
EMG	Eletromiografia
EPM	Erro padrão da média
EUA	Estados Unidos da América
et al.	e outros
FFCLRP	Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
GABA	Ácido gama amino butílico
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP
IASP	<i>International Association for the Study of Pain</i>
ICMS	Micro estimulação intra cortical
IL-1	Interleucina 1
LCE	Labirinto em cruz elevado

LIM	Laboratório de Investigações Médicas
M1	Córtex motor primário
NPY	Neuropeptídeo Y
OMS	Organização Mundial da Saúde
S1	Córtex sensitivo primário
SNC	Sistema nervoso central
sP	Substância P
SP	São Paulo
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
USP	Universidade de São Paulo

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Médias do peso em gramas dos animais do grupo 14 dias.....	43
Tabela 2.	Médias do peso em gramas dos animais do grupo 28 dias.....	43
Tabela 3.	Valores dos limiares de sensibilidade mecânica facial em gramas do lado ipsilateral à indução da doença periodontal.....	45
Tabela 4.	Avaliação da sensibilidade mecânica facial no coxim das vibrissas, em gramas, comparativamente entre os lados ipsilateral e contralateral à indução da doença periodontal, aos 14 e 28 dias respectivamente.....	46
Tabela 5.	Parâmetros de ansiedade do labirinto em cruz elevado para o Grupo de Estudo nos dois períodos estudados.....	47
Tabela 6.	Parâmetros de ansiedade do labirinto em cruz elevado para o Grupo <i>Sham</i> nos dois períodos estudados.....	48
Tabela 7.	Parâmetros de ansiedade do labirinto em cruz elevado para o Grupo Controle nos dois períodos estudados.....	49
Tabela 8.	Parâmetros de ansiedade do labirinto em cruz elevado para os Grupos de Estudo, <i>Sham</i> e Controle aos 14 dias.....	50
Tabela 9.	Parâmetros de ansiedade do labirinto em cruz elevado para os Grupos de Estudo, <i>Sham</i> e Controle aos 28 dias.....	51
Tabela 10.	Comparação entre lado ipsilateral e contralateral à manipulação intraoral para o número de pontos representativos da mandíbula –mais- vibrissas aos 14 dias.....	56
Tabela 11.	Comparação entre lado ipsilateral e contralateral à manipulação intraoral para o número de pontos representativos da mandíbula –mais- vibrissas aos 28 dias.....	57

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1.	Avaliação do peso médio dos animais nos três momentos verificados ao longo do experimento.....	44
Gráfico 2.	Número de pontos que evocaram movimento de mandíbula-mais-vibrissas de acordo com os grupos e tempo de doença.....	55
Gráfico 3.	Número de pontos que evocaram movimento de vibrissas de acordo com os grupos e tempo de doença.....	56
Gráfico 4.	Número de pontos no hemisfério ipsilateral e contralateral que evocaram movimento de mandíbula-mais-vibrissas de acordo com os grupos e tempo de doença.....	57
Gráfico 5.	Número de pontos no hemisfério ipsilateral que evocaram movimento de mandíbula -mais-vibrissas.....	58
Gráfico 6.	Número de pontos no hemisfério contralateral que evocaram movimento de mandíbula -mais-vibrissas.....	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Desenho esquemático da linha do tempo do experimento.....	31
Figura 2.	Mesa cirúrgica com animal sedado e posicionado para procedimento.....	32
Figura 3.	Localização dos dentes posteriores inferiores após afastamento da mucosa jugal e língua.....	33
Figura 4.	Esquema ilustrativo de corte sagital da mandíbula do animal demonstrando o posicionamento da amarria (semi-círculo vermelho).....	33
Figura 5.	Conjunto de filamentos de von Frey.....	34
Figura 6.	Vista lateral da cabeça de um rato Wistar evidenciando as vibrissas e o coxim das vibrissas. A área de eleição para o estímulo com os filamentos de von Frey está representada pelo círculo tracejado	34
Figura 7.	Esquema ilustrativo do labirinto em cruz elevado (adaptado de (Adaptado de http://www.e-physcience.com/services/behavioral-tests/elevated-plus-maze/ , acesso dia 10/11/2016).....	35
Figura 8.	Craniotomia do animal posicionado no aparelho estereotáxico.....	38
Figura 9.	Representação esquemática ilustrativa, sem escala, da área abrangida no mapeamento cortical motor. Porção mais anterior do córtex cerebral do rato (Krieg, 1946).....	40
Figura 10.	Mapa cortical motor do rato.....	41
Figura 11.	Mandíbula dissecada para comparação entre o lado com doença periodontal de 14 dias (detalhe) e o saudável.....	45
Figura 12.	Mapa do córtex motor dos animais do Grupo de Estudo aos 14 dias (n=6). Os valores correspondem à porcentagem (%) de animais que tiveram movimentos evocados na região corporal correspondente. 0= linha média. De -3 a 0: hemisfério esquerdo. De 0 a 3: hemisfério direito. Codificação: Azul = vibrissas. Verde = mandíbula (valor superior) + vibrissas (valor inferior). Lacunas em branco sem numeração = áreas que não foram possíveis mapear.....	52

- Figura 13. Mapa do córtex motor dos animais do Grupo de Estudo aos 28 dias (n=6). Os valores correspondem à porcentagem (%) de animais que tiveram movimentos evocados na região corporal correspondente. 0= linha média. De -3 a 0: hemisfério esquerdo. De 0 a 3: hemisfério direito. Codificação: Azul = vibrissas. Verde = mandíbula (valor superior) + vibrissas (valor inferior). Lacunas em branco sem numeração = áreas que não foram possíveis mapear..... 52
- Figura 14. Mapa do córtex motor dos animais do Grupo *Sham* aos 14 dias (n=6). Os valores correspondem à porcentagem (%) de animais que tiveram movimentos evocados na região corporal correspondente. 0= linha média. De -3 a 0: hemisfério esquerdo. De 0 a 3: hemisfério direito. Codificação: Azul = vibrissas. Verde = mandíbula (valor superior) + vibrissas (valor inferior). Lacunas em branco sem numeração = áreas que não foram possíveis mapear..... 53
- Figura 15. Mapa do córtex motor dos animais do Grupo *Sham* aos 28 dias (n=5). Os valores correspondem à porcentagem (%) de animais que tiveram movimentos evocados na região corporal correspondente. 0= linha média. De -3 a 0: hemisfério esquerdo. De 0 a 3: hemisfério direito. Codificação: Azul = vibrissas. Verde = mandíbula (valor superior) + vibrissas (valor inferior). Lacunas em branco sem numeração = áreas que não foram possíveis mapear..... 53
- Figura 16. Mapa do córtex motor dos animais do Grupo Controle aos 14 dias (n=5). Os valores correspondem à porcentagem (%) de animais que tiveram movimentos evocados na região corporal correspondente. 0= linha média. De -3 a 0: hemisfério esquerdo. De 0 a 3: hemisfério direito. Codificação: Azul = vibrissas. Verde = mandíbula (valor superior) + vibrissas (valor inferior). Lacunas em branco sem numeração = áreas que não foram possíveis mapear..... 54
- Figura 17. Mapa do córtex motor dos animais do Grupo Controle aos 28 dias (n=6). Os valores correspondem à porcentagem (%) de animais que tiveram movimentos evocados na região corporal correspondente. 0= linha média. De -3 a 0: hemisfério esquerdo. De 0 a 3: hemisfério direito. Codificação: Azul = vibrissas. Verde = mandíbula (valor superior) + vibrissas (valor inferior). Lacunas em branco sem numeração = áreas que não foram possíveis mapear..... 54

Varotto BLR. *Avaliação da sensibilidade mecânica, ansiedade e neuroplasticidade cortical motora em ratos submetidos à doença periodontal experimental* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

INTRODUÇÃO: Sabe-se que a doença periodontal é a doença infecciosa crônica mais prevalente na população adulta, acometendo 1/5 da população em fase ativa de trabalho e causadora de dor. As citocinas e demais substâncias moduladoras da inflamação que promovem e perpetuam a doença periodontal interagem e agravam outras doenças como o diabetes mellitus, aterosclerose e doenças autoimunes. O periodonto, com suas aferências proprioceptivas especializadas, desempenha importante papel de regulação dos movimentos da mastigação. Apesar da região orofacial ter uma ampla área de representação no córtex cerebral não se sabem os efeitos de uma inflamação crônica periodontal nesta representação. Ansiedade e estresse são conhecidos fatores correlacionados à doença periodontal e moduladores de condições dolorosas. Assim, são objetivos deste estudo a avaliação da sensibilidade mecânica em vibrissas, avaliação da ansiedade e o mapeamento do córtex motor de ratos com doença periodontal de 14 e 28 dias de evolução.

MÉTODOS: Foram utilizados ratos Wistar machos pesando inicialmente entre 140 e 180 gramas, divididos em 3 grupos principais: grupo controle, grupo *sham* e grupo de estudo, em que a doença periodontal foi induzida por amarração no primeiro molar inferior direito. Os animais foram avaliados com 14 e 28 dias de doença, sendo a sensibilidade mecânica aferida por filamentos de Von Frey e a ansiedade avaliada por meio do labirinto em cruz elevado. O mapeamento do córtex motor foi realizado por estimulação elétrica epidural de um a dez volts.

RESULTADOS: Ambos os períodos de evolução da doença causaram alterações condizentes com doença periodontal. Não houve diferenças no ganho de peso dos animais independente do grupo ao longo do estudo. Nos animais com 28 dias de doença houve maior nocicepção no lado doente com diferença estatística ($p=0,042$). Os animais do grupo de estudo 14 dias demonstraram mais comportamentos sugestivos de ansiedade nos parâmetros de congelamento ($p=0,031$), entradas nas extremidades dos braços abertos ($p=0,048$) e esticamento nos braços abertos ($p=0,047$) do labirinto em cruz elevado do que os grupos *sham* e controle. Os animais do grupo de estudo de 28 dias apresentaram maior comportamento de dor e medo observado através da presença do congelamento ($p=0,016$). O mapeamento do córtex motor evidenciou áreas representativas da mandíbula sobrepostas à área das vibrissas. Foi observada uma expansão da área da mandíbula no grupo da doença periodontal de 14 dias ($p=0,038$).

CONCLUSÃO: A doença periodontal com 14 dias de evolução causou um aumento da resposta motora ipsilateral da mandíbula-mais-vibrissas e alterações de comportamento sugestivas de ansiedade.

Descritores: modelos animais; doenças periodontais; dor orofacial; nociceptividade; ansiedade; córtex motor; mapeamento encefálico.

Varotto BLR. *Mechanical sensibility, anxiety and motor cortex plasticity in rats with experimental periodontal disease* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2017.

BACKGROUND: Periodontal disease is the most prevalent chronic infectious disease in adults, affecting 1/5 of people in active phase of labor and causing pain. Cytokines and substances that modulate inflammation promote and perpetuate periodontal disease, interacting and worsening other conditions such as diabetes mellitus, atherosclerosis and autoimmune diseases. The periodontium has specialized proprioceptive afferents and plays a role in the regulation of masticatory movements. Despite the wide brain cortical representation area of the orofacial structures, the periodontium has not been described in the literature and the effects of a chronic inflammation in its representation has not been clarified. Anxiety and stress are factors correlated to periodontal disease and modulators of pain. The aim of this study was to evaluate vibrissae nociception through mechanical response, anxiety and the motor cortex mapping in rats with periodontal disease after 14 or 28 days of evolution. **METHODS:** Male Wistar rats (initial weight 140-180 grams) divided into 3 main groups: controls, sham and periodontal disease induced by placement of a cotton ligature in the mandibular right first molar tooth. The evaluations took place after 14 or 28 days of disease. Mechanical response was evaluated by von Frey filaments and anxiety was evaluated through the elevated plus maze. Epidural electrical stimulation (1 to 10 volts) was the method used for the cortical motor mapping. **RESULTS:** Both evolution periods caused clinical outcomes consistent to periodontal disease. There was no difference in the weight gain of the animals, whatever the group during the study. The animals with 28 days appeared to have a higher nociception in the side affected, with statistical difference ($p=0.042$). Animals with the disease evolution through 14 days showed more anxious behavior seen by freezing ($p=0.031$), entries in the extremities of open arms ($p=0.048$) and stretching in open arms ($p=0.047$) than the sham and control groups, in the elevated plus maze test. The 28 day disease evolution group showed more pain and fear behavior, seen by freezing ($p=0.016$). The cortical motor mapping showed an overlapping of jaw and vibrissae areas. There was an expansion of the mandibular area in the 14-day disease group ($p=0.038$). **CONCLUSION:** at 14-days, PD led to an expansion of the mandibular-plus-vibrissae motor cortical representation ipsilateral to the disease and behaviors suggestive of anxiety.

Descriptors: models, animal; periodontal disease; orofacial pain; nociception; anxiety; motor cortex; brain mapping

1 INTRODUÇÃO

Queixas de dor são motivos frequentes de procura por assistência à saúde. No segmento orofacial, embora pequeno proporcionalmente ao corpo, existem inúmeras fontes de dor, algumas relacionadas a doenças conhecidas como a cárie dentária e a doença periodontal, outras menos frequentes, como as decorrentes de neuralgias trigeminais e de procedimentos cirúrgicos ou odontológicos, além daquelas com risco potencial à vida como as que indicam a presença de tumores. Quando crônicas, estas doenças ou dores têm alto impacto no sistema público de saúde, pois demandam necessidade permanente de tratamento ou controle. Portanto, as dores orofaciais têm origens diversas, diagnóstico complexo e afetam a qualidade de vida dos pacientes. São muito comuns na população em geral e têm como seu principal representante as odontalgias, que atingem parcela importante da população brasileira.

A doença periodontal (DP), uma potencial causa de odontalgia e que afeta os tecidos de proteção e sustentação dentária, é a doença inflamatória crônica mais presente na população adulta. Esta doença tem sido relacionada à diversas condições sistêmicas, como parto prematuro e recém-nascidos com baixo peso, doenças vasculares como arterosclerose e *diabetes mellitus*, e também com cefaleias e dores crônicas craniofaciais. Estudos clínicos do nosso grupo mostram que a DP crônica apresenta um padrão de dor referida com características difusas, que nem sempre é identificado.

Sabe-se que, particularmente na dor crônica, ocorrem mudanças neuroplásticas significativas no sistema nervoso central, especificamente nas áreas corticais relacionadas à sensibilidade e à motricidade. Além disso, a literatura científica tem demonstrado nos últimos anos que a participação de infecções crônicas contribui de maneira significativa para a manutenção da dor. Na região orofacial, estudos mostraram que doenças infecciosas crônicas comuns, como a doença periodontal, podem contribuir para queixas crônicas de dores craniofaciais e também para a persistência de cefaleias primárias, como a enxaqueca e a cefaleia tipo tensão. Entretanto os mecanismos envolvidos nestas anormalidades não estão claramente entendidos até o presente momento.

Transtornos de ansiedade estão relacionados tanto com a evolução da doença periodontal quanto com a percepção de dor do paciente. A ansiedade pode surgir como resultado da dor aguda, porém também modula a percepção da dor crônica, devido ao estado de estresse, elevação da preocupação, e aumento da tensão muscular.

Tanto a doença periodontal quanto a dor crônica orofacial e os transtornos de ansiedade delas decorrentes, são altamente prevalentes na população brasileira. Para a melhoria das abordagens terapêuticas destas condições há a necessidade de estudos experimentais que auxiliem na compreensão dos mecanismos envolvidos nestas doenças. Desta forma é proposto este estudo experimental sobre os desdobramentos da doença periodontal quanto a sensibilidade mecânica da região orofacial, ansiedade e alterações neuroplásticas no córtex motor.

2 OBJETIVOS

Avaliar os seguintes aspectos da doença periodontal, utilizando um modelo experimental em ratos, com 14 e 28 dias de evolução:

- 1) Avaliar a sensibilidade mecânica facial no coxim das vibrissas.
- 2) Avaliar os parâmetros de comportamento de ansiedade dos animal.
- 3) Avaliar a resposta motora mandibular à estimulação elétrica transdural do córtex motor.

3 REVISÃO DE LITERATURA

A doença periodontal (DP) é frequente na população mundial e embora tenha tratamento conhecido e eficaz nem sempre é reconhecida, uma vez que seus sinais e sintomas são considerados irrelevantes pelos pacientes. Sendo doença infecciosa ela tem implicações locais e sistêmicas reconhecidas epidemiológica e patologicamente.

Entre as linhas de pesquisa em Dor Orofacial desenvolvidas nos últimos anos pela Equipe de Dor Orofacial da Divisão de Odontologia e do Centro Interdisciplinar de Dor do Departamento de Neurologia do Hospital das Clínicas da FMUSP está uma que estuda a DP e suas implicações sistêmicas, incluindo as dores crônicas. Várias dissertações teses e artigos foram publicados pelo grupo abrangendo as interrelações com doenças reumatológicas, neurológicas, incluindo as cefaleias e outras dores orofaciais (Siqueira et al., 2004; Savioli et al., 2004; Savioli et al., 2010; Savioli et al., 2012; Siqueira et al., 2010; Fernandes et al., 2007; Fabri et al., 2009; Fabri et al., 2014a; Fabri et al., 2014b; Fabri et al., 2014c; Rolim et al., 2014). Estudos clínicos sobre dor crônica e doença periodontal indicam que na manifestação clínica desta última o padrão de dor difusa se sobrepõe, sendo o óxido nítrico um possível mediador desta condição. Além disso, ela também afeta negativamente a qualidade de vida dos pacientes. Foi demonstrado em estudo do grupo, em modelo experimental, a relação entre dor crônica e o córtex motor (Fonoff et al., 2009a). O conjunto de informações que a literatura científica fornece no presente momento indica que a DP crônica causa sensibilização

central, alterações neuroplásticas e de comportamento, como ansiedade, entretanto não existem dados sobre sua ação nos efeitos motores secundários à dor.

3.1 Dor orofacial

A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) descreve dor como “uma experiência sensitiva e emocional desagradável, decorrente ou descrita em termos de lesões teciduais reais ou potenciais” (Merskey e Bogduk, 1994). Como “dor orofacial” é uma denominação genérica, podendo ser o sintoma de diversas doenças que afetam as estruturas da cavidade bucal e adjacências, como nos casos das dores referidas, sua investigação deve ser interdisciplinar e criteriosa. A dor pode ser classificada em aguda e crônica. A dor aguda tem início recente, e é importante sinal de alerta para possíveis lesões teciduais, desencadeando ainda uma resposta de fuga, defesa e remoção do agente causal – o que leva ao desaparecimento da mesma. Já a dor crônica, que persiste por mais de 6 meses, não tem esse papel biológico de proteção e não cessa com a remoção da causa (Merskey e Bogduk, 1994; Sessle, 2006).

As dores orofaciais são muito frequentes na população e possuem um diagnóstico desafiador, visto que várias são as condições que podem acometer esta região. O estudo criterioso de uma amostra de 26 pacientes brasileiros com dores orofaciais persistentes evidenciou que sete pacientes sofriam de odontalgia por pulpite, nove pacientes apresentavam disfunções temporomandibulares de caráter articular ou muscular e quatro pacientes possuíam neuralgia do trigêmeo. Também foram verificadas na amostra

pacientes com dor orofacial por fibromialgia, neuralgia e odontalgia atípicas, cefaleias e câncer (Siqueira et al., 2004). Em outro estudo brasileiro contendo uma amostra maior de pacientes adultos e idosos foi verificado que a prevalência de dor no segmento orofacial foi de 55,5%. A cefaleia foi mais prevalente no grupo adulto. O bruxismo foi verificado em 10,6% dos pacientes e odontalgia em 10,2% (de Siqueira et al., 2015). A neuralgia do trigêmeo, dor neuropática paroxística que respeita o trajeto dos ramos do nervo trigêmeo, acomete principalmente mulheres na faixa etária de 50 anos, e é descrita como uma das piores dores existentes (Grossman et al., 2016). Já a neuralgia pós herpética muito prevalente na região torácica também pode acometer a face em 25% dos casos (Alvarez et al., 2007). A síndrome da ardência bucal é outra condição crônica que acomete esta região e pode ter uma prevalência na população geral que varia de 0,7% a 15%, sendo mais prevalente em mulheres após a menopausa (Nasri-Heir et al., 2015). Foi verificado que a doença periodontal parece interferir negativamente no tratamento destas condições dolorosas crônicas (Fabri et al., 2009).

Sabe-se que tanto experimentalmente quanto clinicamente, a dor crônica pode alterar estados de comportamento, levando a ansiedade e depressão. Foi demonstrado que estas manifestações de ansiedade relacionadas a dores neuropáticas são mais evidentes quatro semanas após a instalação da dor (Leite-Almeida et al., 2012). Pacientes com dor e doença periodontal concomitantes aparentam ter uma pior qualidade de vida, porém o tratamento da doença periodontal tende a melhorar o perfil psicológico e diminui significativamente os descritores de dor utilizados (Fabri et al., 2014a).

A inervação sensitiva da cabeça decorre principalmente do nervo trigêmeo, entretanto, participam também os nervos facial, glossofaríngeo e vago. Quando do início da dor, no local ocorre a sensibilização periférica com hiperalgesia primária. A diminuição dos limiares nociceptivos vai facilitar e aumentar a percepção do estímulo álgico. Os estímulos provenientes desta região periférica convergem no núcleo do trato espinal do nervo trigêmeo, o que contribui para o fato das dores deste segmento serem mal localizadas, difusas e referidas (Sessle, 2005). O núcleo do trato espinal do trigêmeo no tronco cerebral é uma continuidade da medula espinal, o que colabora para a grande integração anátomo funcional de aferências provenientes da região cervical e da região orofacial (Sessle, 2005). Neste local, já em nível de sistema nervoso central (SNC), são encontrados mediadores químicos envolvidos com a sensação dolorosa como o glutamato e substância P (sP), serotonina, encefalina e ácido gama amino butírico (GABA). A intensidade da dor orofacial no SNC é modulada neste nível, através de interneurônios inibitórios e projeções neurais descendentes (Sessle, 2006).

Quando o indivíduo se encontra em uma situação de dor, ocorre uma estimulação das estruturas motoras e pré motoras para gerar comportamentos que previnam, reduzam ou removam a dor causada pelos estímulos nocivos, sejam eles internos ou externos, a exemplo do que acontece nos reflexos antálgicos decorrentes de alterações no SNC. Esta estimulação ocorre na porção caudal do núcleo espinal do nervo trigêmeo, através da interrelação entre duas populações neuronais: uma mais superficial (presentes nas lâminas I e II) e outra mais profunda (presentes nas lâminas V e

VI). A atividade dos neurônios nociceptivos superficiais representa aspectos negativos da sensação somática, enquanto a atividade dos neurônios das camadas profundas representa aspectos motivacionais. Esta representação dos aspectos motivacionais no sistema trigeminal é um dos mais primitivos, e quando este alcança os circuitos pré motores, pode gerar comportamentos de congelamento e fuga (Sewards e Sowards, 2002).

Porém, ao invés de acionar os mecanismos supressores da dor, também é possível que ocorra uma facilitação do estímulo do aferente primário para o segundo neurônio e este fenômeno denomina-se sensibilização central. As alterações provenientes da sensibilização central são acompanhadas de desinibição e redução dos limiares, gerando a hiperalgesia secundária. Este quadro é o responsável pelas respostas aumentadas a estímulos nocivos e também a estímulos não dolorosos (Woolf, 2011).

Estudo de neuroimagem com pacientes demonstrou um padrão diferente de ativação do SNC durante estímulos de dor aguda entre a mão e o dente incisivo superior. Os pacientes foram monitorados por ressonância magnética funcional durante a aplicação dos estímulos dolorosos de pressão na mão e elétrico na polpa do dente incisivo. Durante o estímulo na mão foi observado uma predominância de ativação do córtex sensitivo primário (S1) contralateral. Já o estímulo doloroso dental levou a ativação do S1 bilateral e do córtex motor primário (M1) ipsilateral (Jantsch et al., 2005).

Também foram observadas alterações em pacientes com dor orofacial crônica após o tratamento. Quatorze pacientes, 12 com dor tipo miofascial e dois com deslocamento anterior de disco com redução, foram

avaliados com eletromiografia (EMG) e ressonância magnética funcional antes e após duas semanas de tratamento com placa miorrelaxante. As avaliações foram feitas enquanto os pacientes realizavam movimentos de abertura e fechamento bucal de forma a avaliar também a simetria deste movimento. Foram estudadas as regiões de M1, ínsula e cerebelo. Após duas semanas de uso da placa, todos os pacientes melhoraram da dor na escala visual analógica. Os autores observaram que a diminuição da dor foi condizente com uma diminuição da representação orofacial na ínsula, e que o aumento da simetria dos movimentos mandibulares foi correlacionado com uma diminuição da representação orofacial no M1 e no cerebelo durante o movimento de oclusão dentária (Lickteig et al., 2013).

Os processos imunológicos periféricos podem influenciar e serem influenciados diretamente pela atividade neuronal (Wrona, 2006). No SNC, as células da glia, representantes do sistema imune, são moduladas por neurotransmissores como o glutamato e citocinas (Sessle, 2006). Um exemplo da importância desta interação, é que a glia ativada pela interleucina 1 (IL-1) por sua vez ativa células endoteliais que produzem fatores tróficos e são importantes na memória, plasticidade neuronal e neurogênese (Avital et al., 2003; Yirmiya et al., 2011), podendo influenciar inclusive as dores neuropáticas (Gao et al., 2010; Grace et al., 2011).

Clinicamente, observou-se que pacientes com perfil de catastrofização e ansiedade são mais susceptíveis a desenvolverem dores crônicas pós-operatórias (Theunissen et al., 2012). Além disto, a forma de enfrentamento de uma dor aguda pós-operatória, relacionada diretamente a

níveis de ansiedade e depressão dos pacientes, também pode colaborar para a cronicidade da dor (Vickers et al., 2006).

3.2 Doença periodontal

O periodonto é um complexo formado pelos processos ósseos alveolares da mandíbula e maxila, ligamento periodontal, cimento dentário e gengiva. Promove a proteção e sustentação dos dentes necessárias para a manutenção de suas funções, como a mastigação, e contribui para a saúde da cavidade bucal. Desta forma, é dividido em periodonto de proteção (gengiva) e periodonto de sustentação (processos ósseos alveolares, cimento e ligamento periodontal) (Lindhe et al., 2010).

A inervação dos dentes, incluindo o periodonto, ocorre a partir de fibras sensitivas, provenientes dos ramos maxilar e mandibular do nervo trigêmeo. Estão presentes fibras A β (mielinizadas, com 6 a 10 μ m de diâmetro), A δ (mielinizadas, com 1 a 5 μ m de diâmetro) e C (não mielinizada com 0,1 a 1 μ m de diâmetro). Estas fibras contribuem para a inervação da vasculatura crânio facial, incluindo a polpa dental e o periodonto e possuem neuropeptídeos como a sP, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e principalmente o neuropeptídeo Y (NPY) (Byers et al., 1999; Maeda et al., 1999; Lundy et al., 2004). Estas fibras, provenientes do núcleo mesencefálico do nervo trigêmeo possuem características próprias e acabam como terminações nervosas livres (nociceptores) ou como receptores especializados (mecanoreceptores) (Byers et al., 1986; Lundy et al., 2004). A regulação do ritmo e da força de mastigação ocorre devido à interação dos mecanoreceptores do periodonto com os proprioceptores musculares e

tendíneos, o que confere uma grande sensibilidade mecânica aos dentes, que podem identificar estruturas da espessura de 10 a 30 μm (Lindhe et al., 2010).

Experimentalmente foi estudada a atividade dos mecanorreceptores do nervo alveolar inferior dos molares e incisivos de ratos Wistar *in vitro*. A atividade nervosa foi aferida pela estimulação das terminações nervosas com filamentos de von Frey calibrados em 1.1, 2.9, 7.8, 11.8 e 17.2 micro Newtons (mN) no ligamento periodontal dos incisivo e molares inferiores. Foi observada a presença de receptores de adaptação rápida e lenta, a maioria do tipo A β nos incisivos. Nestes dentes o limiar de atividade unitária foi de 11.8 mN e nos molares variou entre 2.9 a 11.8 mN. Nos dentes molares a maioria das fibras aferentes eram responsáveis pela inervação de mais de um dente. Os autores sugerem que cada tipo de dente e fibra podem ter funções diferentes na regulação da mastigação (Ishii et al., 2002).

Após a perda dos dentes a capacidade de percepção mandibular é mantida e recebe denominação genérica de osteopercepção, pois possivelmente os mecanorreceptores musculares e tendíneos contribuem para o processo total. Especula-se que pacientes edêntulos tenham um mapa sensitivo cortical diferenciado, entretanto, faltam estudos a respeito. Em indivíduos reabilitados por implantes, há um aumento substancial do limiar da sensibilidade tátil fornecida pela prótese em relação ao paciente que utiliza dentaduras convencionais. Entretanto, a percepção entre dentes naturais é maior, mais que o dobro do fornecido por implantes (Klineberg et al., 1999).

O termo doença periodontal (DP) abrange as doenças que afetam o periodonto (Apêndice 1). As de caráter infeccioso, denominadas gengivite,

quando afetam o periodonto de proteção; ou periodontites, quando afetam o periodonto de proteção e de sustentação, são condições muito prevalentes na população adulta (Armitage, 1999). O último levantamento nacional de saúde bucal do Ministério da Saúde (Projeto SB Brasil, 2010) mostra que a doença periodontal avançada está presente em 19% da população na faixa etária de 35 a 44 anos (Brasil, 2010).

A etiologia da DP é multifatorial, a dieta alimentar e qualidade da escovação dental que influenciam primordialmente na quantidade de placa bacteriana acumulada (Lang et al., 2003); a microbiota do indivíduo presente na placa bacteriana, morbidades associadas e a própria genética também são responsáveis (Armitage, 1999). Sendo doença infecciosa, pode ser progressiva e ter desdobramentos locais, como perda de dentes, halitose e deficiência mastigatória; ou sistêmicas, na qual a infecção através da bacteremia transitória pode ter importantes repercussões em diversas áreas do organismo. Portanto, a DP é um fator de risco para doenças como *diabetes mellitus* e parto prematuro, doenças cardíaco vasculares, doenças neuro vasculares, dentre outras (Williams et al., 2010).

Estudos realizados mostram que a doença periodontal interfere no metabolismo da glicose pelo cérebro (Ilievsky et al., 2016), pode ser uma morbidade associada à doença de Alzheimer (Kamer et al., 2008; Rolim et al., 2014), à dor crônica crânio facial (Fabri et al., 2009) e pode interferir na terapêutica medicamentosa de pacientes com artrite reumatóide grave (Savioli et al., 2012). Além disto, pacientes adolescentes com artrite reumatóide ou lúpus eritematoso sistêmico parecem ter maior risco ao desenvolvimento da

doença periodontal a qual, por sua vez, pode interferir agravando a doença (Fernandes et al., 2007; Savioli et al., 2012).

A DP, embora com múltiplas origens, tem seu tratamento essencialmente operatório, com intervenções de acordo com o grau da doença, além da orientação e educação dos pacientes sobre a importância de se manter a higiene bucal satisfatória de forma a reduzir a placa bacteriana e a microbiota patogênica presente (Rylander et al., 2010). O uso de antibióticos pode ser necessário a depender do estágio da doença e da condição clínica do paciente (Mombelli, 2010).

Em estudos experimentais foi observada uma relação entre dor inflamatória e o desempenho em testes de ansiedade, o que demonstra uma correlação entre inflamação, comportamento cognitivo e o SNC (Parent et al., 2012). Por sua vez, pesquisa clínica correlacionou uma pior habilidade de enfrentamento de estresse e ansiedade com perda óssea mais pronunciada em pacientes com doença periodontal, sendo que não houve diferenças entre os grupos em relação ao sexo, faixa etária e quantidade de cálculo e placa (Ayub et al., 2010; Rossa-Júnior et al., 2009).

3.3 Dor devido à Doença Periodontal

A inflamação e infecção dos tecidos periféricos, incluindo a região orofacial periodontal, induzem a alterações imunológicas no SNC que contribuem para a cronicidade da dor e conseqüentemente a sensibilização central, com produção de neuropeptídeos e citocinas inflamatórias que aumentam a hiperalgesia (Watkins et al., 2000; Sessle, 2005; Sessle, 2006).

Observou-se que a DP experimental, em ratos, foi capaz de ativar o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, elevando no sangue os níveis de cortisol. O cortisol é um hormônio relacionado ao estresse, atua como um marcador desta condição, e a longo prazo pode causar imunossupressão (Breivik et al., 2001b).

Neuropeptídeos são considerados os principais agentes no processo inflamatório por colaborar na manutenção da inflamação neurogênica. Dentre eles, a sP é presente em grande quantidade na raiz dorsal e gânglio trigeminal e colabora na transmissão do estímulo nocivo. Quando ocorre algum dano tecidual periférico a sP é liberada induzindo a vasodilatação e aumento da permeabilidade capilar; o que permite o extravasamento de plasma e degranulação de mastócitos, que por sua vez irão liberar histamina e citocinas pró-inflamatórias, o que se chama de “sopa inflamatória”. Esses mediadores não ficam contidos apenas nos locais de lesão e se espalham pelos tecidos adjacentes causando hiperalgesia secundária (Sacerdote e Levrini., 2012; Sessle, 2005).

Sabe-se que na doença periodontal a sP está correlacionada com aumento da profundidade de sondagem e o tratamento da DP tende a diminuir os níveis deste neuropeptídeo no fluido crevicular gengival (Lundy et al., 2004; Lundy et al., 2000).

Outro mediador da inflamação com papel importante na DP são as interleucinas, dentre elas a IL-1, que parece iniciar os fenômenos de collagenase, destruição óssea e ativação das metaloproteinases. Os genes relacionados à IL-1 têm uma expressão acentuada no início e progressão da DP (Ebersole et al., 2014). De forma análoga à sP, os níveis de IL-1 diminuem

no fluido crevicular após o tratamento da DP e controle de placa bacteriana (Reis et al., 2014); produzida principalmente pelos linfócitos B, esta citocina também está relacionada a alterações neuroplásticas mediadas pela glia, no corno posterior da medula espinal, além de alterações nos processos de memória mediados pelo hipocampo (Avital et al., 2003).

Estudos do grupo demonstraram que pacientes com dores crônicas orofaciais refratárias ao tratamento passaram a responder melhor às terapias instituídas após o tratamento da DP associada, provavelmente pelo tratamento da DP levar a uma diminuição das citocinas inflamatórias presentes na região (Fabri et al., 2009). O tratamento da DP em pacientes com dores crônicas orofaciais também foi capaz de melhorar o perfil psicológico e diminuir o uso de descritores de dor (Fabri et al., 2014a). Outro estudo do grupo observou que ao longo do curso da doença periodontal não tratada são expressadas grandes quantidades de óxido nítrico, graças à presença da molécula óxido nítrico sintase, principalmente no tecido gengival de pacientes com dores crônicas craniofaciais e DP concomitantes (Fabri et al., 2014b). Esta presença massiva de mediadores da inflamação, interleucinas e citocinas, nos pacientes com DP não tratada pode explicar o menor efeito das medicações imunobiológicas em pacientes com doenças reumatológicas como a artrite reumatoide (Savioli et al., 2012).

A DP parece ter também uma correlação com o aumento da hipersensibilidade dentinária. Ao teste de alodínia com o frio, ficou evidente que os pacientes com dentes que tiveram perda de inserção devido à DP apresentaram menores limiares de dor e maiores notas para o estímulo

doloroso na escala visual analógica quando comparados a pacientes controles sem DP. Este fato que tem uma explicação mecânica, devido ao aumento da porção radicular exposta ao meio bucal nos pacientes com DP, ocorre também devido ao aumento da expressão de mediadores da inflamação (Rutsatz et al., 2012).

3.4 Doença periodontal experimental

Existem diversos modelos experimentais para a indução da DP e o mais utilizado é em ratos. A utilização de ratos tem sido difundida devido ao fácil manuseio e acomodação destes animais quando comparados a modelos experimentais em primatas, por exemplo, além da estrutura dental e gengival dos dentes molares destes animais serem semelhantes à dos humanos (Struillou et al., 2010).

Em ratos Wistar, a formação da raiz dentária dos dentes molares se inicia com duas semanas de vida e o dente já está em função na terceira semana de vida. Foram relatadas que alterações nas fibras nervosas do ligamento periodontal reativas ao CGRP ocorrem apenas a partir do sexto mês de vida (Jung et al., 2010).

O método que utiliza uma amarria posicionada na junção amelocementária é previsível para a indução da DP nestes animais (Da Silva et al., 2008; Rovin et al., 1966; Struillou et al., 2010). Este modelo tem sido amplamente utilizado para diversos fins, como análise microbiológica e imunológica da DP, comparação entre métodos de avaliação de perda óssea (Lieberman et al., 2010), estudo do efeito de fármacos na progressão da DP

(Cavagni et al., 2005; Peruzzo et al., 2010) e estudo dos efeitos da doença periodontal sobre outros processos fisiológicos e patológicos (Breivik et al., 2002; Breivik et al., 2001a; Breivik et al., 2001b).

3.5 Avaliação experimental da sensibilidade mecânica das vibrissas em ratos

A partir da definição de dor pela IASP, a percepção de um estímulo como doloroso depende das experiências emocionais e psicológicas referentes a cada indivíduo (Merskey e Bogduk, 1994). Já o termo nocicepção abrange apenas a detecção de um estímulo que pode comprometer a integridade física do organismo. Esta detecção é realizada pelos nociceptores e independe das características ou experiências psicoemocionais. Em animais, a dor é avaliada indiretamente através da observação comportamental frente à detecção do estímulo pelos nociceptores. Desta forma, a diminuição do limiar nociceptivo nos animais em pesquisas experimentais tem sido descrita como hipernocicepção (Ferreira et al., 2009).

A sensibilidade mecânica pode ser aferida através de monofilamentos de nylon calibrados (filamentos de von Frey ou estesiômetros de Semmes-Weinstein). A pata do animal geralmente apresenta limiares mais altos que a região orofacial e isto pode influenciar na escolha dos filamentos que serão testados. Para o teste desta região, o animal deve estar habituado ao manuseio do examinador e a permanecer alguns minutos em uma caixa individual. Após este período de habituação, os filamentos devem ser aplicados em ordem crescente de força e o comportamento esperado é que o animal retire a cabeça, buscando escapar do estímulo quando este se tornar aversivo.

Esta técnica foi utilizada com sucesso nos modelos de indução de inflamação com formalina, óleo de mostarda e adjuvante de Freund com antígenos nas regiões de vibrissas e articulação têmporomandibular (Ren, 1999).

Esta metodologia também foi empregada para a avaliação da sensibilidade mecânica em animais submetidos ao modelo de dor neuropática orofacial através da ligadura do nervo infraorbitário. Após um mês, a sensibilidade mecânica da região foi testada com os monofilamentos calibrados. Os filamentos foram aplicados em ordem crescente próximo ao centro do coxim das vibrissas. Cada filamento foi aplicado três vezes consecutivas e foi considerado responsivo o filamento que evocou o movimento de retirada da cabeça ou estímulo de ataque e fuga nas três aplicações (Meunier et al., 2005).

3.6 Avaliação experimental do comportamento de ansiedade em ratos

A partir da necessidade de se testar o efeito de substâncias causadoras de ansiedade e de drogas ansiolíticas, foi criado um método denominado labirinto em cruz elevado (LCE). Trata-se de um método validado com base nas observações feitas há mais de 60 anos, em que ratos em situações não estressantes exploram todos os locais de um novo ambiente, com preferência pelos locais fechados. Por outro lado, ratos com estresse e ansiedade demonstram uma aversão mais pronunciada pelos locais abertos. Assim, este método consiste em um labirinto em formato de cruz, com braços de cerca de 40 centímetros de extensão, elevado do solo cerca de 50 centímetros. Dois braços do labirinto possuem paredes opacas e são

denominados braços fechados. Os outros dois braços não possuem paredes, ou seja, são denominados braços abertos. É possível avaliar a quantidade de entradas nos braços abertos e fechados, bem como se o animal chegou a explorar os braços até sua extremidade final; sendo que quanto maior a ansiedade e estresse do animal menor a sua preferência por explorar as áreas abertas do labirinto (Pellow et al., 1985). Também é possível verificar medidas etológicas como congelamento, indicativo de ansiedade e medo (Bolles e Collier, 1976); e esticamento, indicativo de exploração (Anseloni e Brandão, 1997).

Foi correlacionada a ativação dos mecanismos dopaminérgicos nos sistemas mesolímbico e vias mesocorticais dos animais, através da administração de apomorfina, com um aumento do tempo dispendido, número de entradas e chegadas nas extremidades nos braços abertos do labirinto, provavelmente pelo aumento da ansiedade. Porém as medidas comportamentais parecem não ser afetadas por esta ativação (Garcia et al., 2005). Já o congelamento é provavelmente produzido pela inibição de motoneurônios no núcleo motor e corno anterior da medula espinal através de projeções do núcleo reticular pontino *oralis*, que por sua vez, recebe projeções das colunas ventrolaterais e dorsolaterais da matéria cinzenta periaquedutal e uma projeção fraca do núcleo hipotalâmico. Esta ativação parece ocorrer em momentos de estresse, ansiedade e dor (Sewards e Sowards, 2002).

Inicialmente criado para a avaliação do comportamento de ratos frente a utilização de fármacos e drogas (Pellow et al., 1985), este método tem

sido utilizado também em pesquisas experimentais envolvendo dor, conforme descrições a seguir.

Foi observada relação experimental entre o estresse, ansiedade e dor orofacial induzida em ratos Wistar machos. Primeiramente, os animais foram submetidos ao procedimento para indução de ansiedade através de dois protocolos de estresse por confinamento. Após este período foi realizado o teste do LCE, comprovando por meio dos eventos de entradas e tempo dispendido nos braços abertos que os animais que passaram pelos protocolos estavam mais ansiosos que os controles. A seguir, foi induzida uma dor orofacial através da injeção de 50 microlitros de solução de formalina 1,5% na articulação têmporomandibular. Os animais do maior período de estresse, 40 dias, ficaram mais susceptíveis às respostas nociceptivas como hiperalgesia quando comparados aos animais controles que não estavam ansiosos. Não foram observadas diferenças estatísticas para tempos menores de estresse. (Gameiro et al., 2006).

Outro estudo separou três linhagens de ratos de acordo com os níveis basais de ansiedade aferidos através do LCE. A partir disto, foi realizado um estímulo nociceptivo através da injeção de uma solução plantar de antígenos diluídos em óleo mineral e comparados à um grupo que recebeu injeção de solução fisiológica e um grupo controle. Os autores observaram após 48 horas que em nenhum grupo houve alteração na expressão de citocinas inflamatórias no SNC, porém o grupo de animais mais ansiosos apresentou níveis mais baixos de fator neurotrófico derivado do cérebro no

hipocampo e hipotálamo, o que sugere um pior desempenho em condições de dor (Benatti et al., 2011).

O estresse também parece ter um papel potencializador na percepção de estímulos dolorosos por ratos em um modelo experimental de hiperalgesia dentinária, uma dor de origem dentária frequentemente vinculada a lesões não cariosas. Animais que passaram pelo protocolo de indução da hiperalgesia dentinária e por protocolos de indução de estresse tiveram um aumento importante da hipernocicepção quando da aplicação de um estímulo frio na cavidade bucal, do que animais que foram submetidos à hiperalgesia dentinária mas não ao estresse. Isto sugere que estresse possui um efeito diminuidor dos limiares de dor em ratos (Bergamini et al., 2017).

O LCE foi utilizado para observar diferenças de comportamento em animais submetidos ao modelo de dor neuropática em pata posterior por ligadura do nervo tibial. Os animais foram divididos em grupos de estudo e *sham* e tiveram os procedimentos para a indução da dor realizados ou na pata direita ou na pata esquerda. Após um mês, os animais foram submetidos ao LCE. Todos os animais, independente do lado da lesão e do grupo estudo ou *sham* se comportaram de forma semelhante nos braços fechados. Entretanto os animais com dor neuropática induzida no lado esquerdo permaneceram menor tempo nos braços abertos, com diferença estatística. Já os animais do grupo experimental com dor induzida na pata direita foram semelhantes aos animais *sham*. Os autores acreditam que isto pode evidenciar algum componente comportamental de ansiedade desencadeado pela dor no lado esquerdo (Leite-Almeida et al., 2012).

De forma semelhante, animais submetidos à dor crônica inflamatória em pata ficaram mais estressados e ansiosos e tiveram um pior rendimento no teste de labirinto em cruz elevado (LCE). Este teste foi realizado após 28 dias da indução do modelo de dor na pata posterior. Os animais do grupo com inflamação entraram menos vezes e permaneceram menor tempo nos braços abertos do que o grupo controle, com significância estatística. Não houve diferença entre os grupos controle e doente no número de entradas nos braços fechados. Após a administração de morfina ou diazepam, houve uma melhora do desempenho destes animais no teste, indicando diminuição da ansiedade e depressão (Parent et al., 2012).

3.7 Topografia do córtex cerebral

Sabe-se há mais de 50 anos que o corpo tem uma representação somatotrópica no córtex tanto sensitivo quanto motor. Entretanto, ao contrário do que se imaginou por muito tempo, esta organização não é rígida, estando sujeita a processos dinâmicos que em conjunto se denominam neuroplasticidade (Gardner et al., 2000).

A remodelação destes mapas pode resultar de estímulos ou alterações periféricas intensas, acionando mecanismos de inibição gabaérgica e sinapses com receptores N-metil D-Aspartato (NMDA). Aparentemente, as alterações neuroplásticas e habilidades sensorimotoras adquiridas serão mantidas de acordo com o quão sustentado for o estímulo periférico (Xerri, 2008).

Assim, neuroplasticidade é a capacidade do cérebro se reorganizar após alguma alteração nas aferências periféricas (Henry et al., 2005; Weiss et al., 2000), centrais ou experiências comportamentais (Buonomano et al., 1998; Feldman et al., 2005).

Embora nos mapas dos córtex sensitivo e motor, dentes, gengivas, lábios e mandíbula ocupem uma região significativa, nem sempre é possível uma discriminação (Kandel, 2000). Roedores são utilizados como modelo de estudo animal para avaliar a plasticidade do córtex cerebral e mapear as estruturas orofaciais devido à grande importância desta região, focinho e vibrissas, para sua sobrevivência (Feldman et al., 2005).

3.8 Representação orofacial no córtex cerebral e resposta motora mandibular

Já em 1993, estudos buscavam elucidar a representação da região orofacial no córtex cerebral. Em ratos Long-Evans, através da estimulação do nervo alveolar inferior, responsável pela inervação dos dentes inferiores, foi verificada a representação desses no S1. Esta representação estava presente na porção mais anterior do S1, sobreposta à região dos barris das vibrissas, e mais predominante no hemisfério contralateral à estimulação (Hayama et al., 1993).

Em 2000, foi realizado um estudo do mapeamento da região de vibrissas de ratos albinos após a secção do nervo facial e sua anastomose para reinervação. Após seis meses desse procedimento, foi observado um retorno do movimento das vibrissas, porém, estes eram mais curtos e

descoordenados do que o lado contralateral. O mapeamento foi feito por meio de micro estimulação intra cortical (ICMS) com EMG na região do coxim das vibrissas. Foi realizada uma craniotomia unilateral de 4mm anterior ao bregma e de 0,5 a 4,5mm lateral à linha média. As penetrações da estimulação foram feitas até 200µm de profundidade e com um espaçamento de 500µm entre elas. Os autores citam que a representação das vibrissas parece ter uma conformação variável entre os animais e os hemisférios, bem como uma variância entre estímulos no M1 evocando movimentos em vibrissas contralaterais (mais comum), bilaterais e ipsilaterais (menos comum), mesmo no grupo controle. Além das vibrissas, foi possível mapear áreas representando a pata anterior, pata posterior, mandíbula, língua e olhos, porém estas regiões não foram detalhadas pelos autores. Nos animais que foram submetidos à reinervação, foi observada uma diminuição da área representativa das vibrissas, com regiões de representação não contíguas e uma invasão desta região pela representação da pata anterior (Franchi, 2000).

Buscando refinar o mapeamento das regiões laterais do cérebro de ratos Wistar, Remple e colaboradores (2003) propuseram uma alteração no aparelho estereotático para melhor acesso da região parietal e para estimulação das estruturas orofaciais. Foi realizada a remoção do arco zigomático para o acesso à região do córtex parietal e a cabeça dos animais foi inclinada lateralmente em cerca de 30°. Gravações neuronais multiunitárias foram realizadas perpendicularmente ao córtex e o campo receptivo de cada penetração foi definida pela estimulação das vibrissas e do corpo do animal através de filamentos de von Frey calibrados e sondas. Segundo os autores,

foram encontradas duas áreas laterais ao S1, o córtex sensitivo secundário e a área parieto ventral, que continham uma representação total do corpo do animal, incluindo a região orofacial. Além destas duas regiões, foi evidenciada uma área representativa dos dentes incisivos inferiores, que foi denominada de área mista dos dentes incisivos (Remple et al., 2003).

Estudo experimental em ratos–toupeira pelados (*Heterocephalus glaber*) mostrou que 31% do S1 destes animais é responsável pela área correspondente aos incisivos centrais. Para demonstrar essa representação, foi realizado o mapeamento sensitivo através de uma craniotomia unilateral com remoção da dura mater e gravação da atividade neuronal multiunitária quando um estímulo era realizado na periferia. Segundo o artigo, este resultado expressivo foi encontrado especificamente neste animal, pois o mesmo habita túneis subterrâneos escuros e utiliza os dentes incisivos centrais para colaborar na sua localização espacial (Catania et al., 2002). Cinco a oito meses após a exodontia de um dente incisivo inferior desses animais, foi observado que a região cortical que antes representava o dente extraído foi invadida por aquelas correspondentes à língua, mucosa bucal e ao dente incisivo contralateral, com muitos pontos representando mais que uma estrutura ao mesmo tempo. A representação do incisivo contralateral pode ter ocorrido devido às fibras trigeminais que cruzam a linha média, ou através da interação dessas fibras no corpo caloso. Os animais que tiveram o dente extraído com uma semana de vida tiveram maior área de representação da língua e pontos de representação complexa, representando várias estruturas simultaneamente, do que os animais que tiveram o dente extraído com três semanas de vida. Foram

propostas três hipóteses para este fenômeno de rearranjo cortical: a exposição de conexões que antes estavam latentes, o surgimento de novas conexões a níveis corticais e subcorticais e, como o experimento foi realizado em ratos com uma e três semanas de vida, poderia ter induzido durante o desenvolvimento do animal a ramificação de axônios tálamo-corticais, e este padrão se manteve e se solidificou quando adulto (Henry et al., 2005).

Partindo do fato de que a erupção dos dentes ocorre na mesma época que a maturação do córtex sensitivo, foi realizado um estudo para verificar uma possível correlação entre a perda precoce dos dentes e o desenvolvimento do S1. No relato houve uma diminuição da atividade neural oscilatória quando o córtex foi estimulado no grupo de ratos que tiveram os dentes extraídos precocemente, e isto poderia prejudicar a maturação das redes neurais do córtex sensitivo. Desta forma, os sinais sensitivos enviados pelas terminações nervosas dos dentes e estruturas relacionadas, como o periodonto, parecem ter um papel não apenas de regulação dos movimentos mastigatórios como também para refinar as redes neurais melhorando o processamento de informações sensitivas durante o desenvolvimento (Yoshimura et al., 2008).

O mapeamento do M1 também foi realizado em ratos Sprague-Dawley, pesando entre 290 a 440g. Com o auxílio de EMG, foram mapeadas através de ICMS as regiões do córtex que representam os músculos digástrico anterior, masseter (ambos responsáveis pelos movimentos mandibulares de abertura e fechamento de boca) e genioglosso (língua). Estes pontos estavam localizados entre 2,5 a 4,0 mm anteriores ao bregma, e lateralmente entre 3,0 e

4,0mm. Os pontos representativos destas regiões estavam rodeados por áreas cujas penetrações resultaram em respostas negativas, ou que representavam as vibrissas, pescoço ou tronco. Quando o glutamato, estímulo nocivo, foi aplicado na língua, foram encontradas diferenças na excitabilidade do M1, mas não no mapeamento, mesmo após quatro horas da sua aplicação. Foi concluído que um estímulo intra oral nocivo pode resultar em alterações neuroplásticas prolongadas (Adachi et al., 2008).

O estudo da estimulação elétrica do córtex cerebral, bem como o mapeamento do córtex motor, foi realizado com ratos Wistar a partir da estimulação elétrica transdural. Foram observadas áreas topográficas que geraram a mesma representação em todos os animais, o que gerou um gráfico probabilístico de resposta destes animais frente a esta estimulação. Foi relatada uma grande delimitação das áreas relacionadas com as vibrissas e pescoço, porém as regiões de mandíbula e língua não foram especificadas (Fonoff et al., 2009b).

Também foi demonstrada pelas atividades eletromiográficas induzidas por ICMS que a exodontia de um incisivo inferior de ratos Sprague Dawley pode acarretar, após uma semana, modificações neuroplásticas em M1. Foram descritas mudanças na representação motora aferida pelo ICMS e EMG nos movimentos de abertura bucal, através do músculo digástrico anterior, e protrusão lingual, pela estimulação do músculo genioglosso. Também foram verificadas alterações no S1, do mesmo caráter das visualizadas em M1. Acredita-se que estas alterações podem estar

relacionadas ao comportamento adaptativo do animal à perda do dente (Avivi-Arber et al., 2010).

Outro estudo mostrou que a representação motora orofacial de ratos sofreu alterações após os animais serem submetidos a um aumento da dimensão vertical de oclusão (DVO). Foi observada uma expansão das áreas corticais representativas dos músculos digástricos anteriores bilaterais, responsáveis pelo movimento de abertura da boca através do abaixamento da mandíbula, e genioglosso nas primeiras duas semanas. Entretanto, nos animais que permaneceram oito semanas com o aumento de DVO este fenômeno não foi observado. Acredita-se que pode haver uma alteração transicional da representação cortical motora durante o período de adaptação a uma nova condição, no caso, a mudança na oclusão (Kato et al., 2012).

Movimentos ortodônticos também levam a uma reorganização dos córtex sensitivos e motores, não se sabe se pela dor e desconforto provenientes da ortodontia ou da alteração da oclusão que ocorre quando os dentes se movimentam. Foi observado um aumento no número de pontos no ICMS que evocaram movimentos nos músculos da mastigação e língua concomitantes em animais que foram submetidos a um modelo experimental de ortodontia quando comparados a controles (Sood et al., 2015).

Também em humanos, a estimulação do córtex motor é uma importante ferramenta para o estudo da fisiologia e plasticidade cortical relacionados a eventos de dor. Com o uso de estimulação magnética transcraniana, foi avaliado o efeito motor em língua e masseter da anestesia local e capsaicina, substância considerada irritante, no ligamento periodontal

de um incisivo inferior durante o período de uma hora. Não foram encontradas diferenças entre o grupo controle e os grupos anestesia e capsaicina, o que levou os pesquisadores a concluírem que um estímulo irritante, ou que cause anestesia pelo período de uma hora no ligamento periodontal de um único dente, é pouco para causar uma alteração no arranjo da representação motora e excitabilidade do córtex cerebral (Zhang et al., 2010).

4 MÉTODOS

Esta pesquisa teve a aprovação da Comissão de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, protocolo de pesquisa número 380/12 (Apêndice 2). As experimentações foram realizadas no Laboratório de Investigações Médicas (LIM) 26, na Faculdade de Medicina da USP.

4.1 Animais

Trinta e oito ratos Wistar machos, pesando entre 140 e 180 gramas foram fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Medicina da USP, mantidos em ciclo de luz de 12/12h e com acesso livre a água e ração. Após período de habituação de 72 horas, os animais foram divididos em 6 grupos:

Grupo A – Grupo catorze dias. Animais receberam a intervenção 14 dias antes da data da avaliação.

A.1 – Grupo Controle (n=6): os animais não receberam manipulação.

A.2 – Grupo Sham (n=7): os animais receberam a amarra para a indução da DP, porém a mesma foi removida logo em seguida.

A.3 – Grupo de Estudo (n=7): os animais receberam a amarra para a indução da DP.

Grupo B – Grupo vinte e oito dias. Os animais receberam as intervenções 28 dias antes da data da avaliação.

B.1 – Grupo Controle (n=7): os animais não receberam manipulação.

B.2 – Grupo Sham (n=5): os animais receberam a amarra para a indução da DP, porém a mesma foi removida logo em seguida.

B.3 – Grupo de Estudo (n=6): os animais receberam a amarra para a indução da DP.

O peso dos animais foi aferido semanalmente. O organograma do estudo foi desenhado de forma que os animais tivessem a mesma idade no momento das avaliações e do mapeamento cortical (Figura 1).

Figura 1. Desenho esquemático da linha do tempo do experimento

4.2 Indução da doença periodontal

Após a anestesia com Xilazina (50mg/kg intramuscular – Anasedan, Ceva Saúde Animal Ltda, Paulínea, SP) e Cetamina (100 mg/kg intramuscular

– Cetamin, Syntec, Santana de Parnaíba, SP), os animais dos Grupos de Estudo e *Sham* foram posicionados em uma mesa cirúrgica específica para intervenções na cavidade oral. Graças à presença de alças e elásticos, foi possível manter o animal com a boca aberta ao longo de todo o procedimento (Figura 2). Após o afastamento da língua e bochechas para a localização dos dentes posteriores inferiores (Figura 3), uma amarria com fio de algodão foi posicionada ao redor do primeiro molar inferior direito, acomodada próxima à margem gengival. O dente molar foi escolhido por se assemelhar aos dentes humanos, uma vez que em roedores os dentes incisivos apresentam um crescimento permanente, com características periodontais próprias (Rovin et al., 1966; Struillou et al., 2010). Ver a figura 4.

Figura 2. Mesa cirúrgica com animal sedado e posicionado para procedimento

Figura 3. Localização dos dentes posteriores inferiores após afastamento da mucosa jugal e língua

Figura 4. Esquema ilustrativo de corte sagital da mandíbula do animal, demonstrando o posicionamento da amarrria (semi-círculo vermelho)

4.3 Teste de sensibilidade mecânica

Este teste foi realizado através de filamentos de von Frey aos 14 e 28 dias (Figura 5). Os animais passaram por habituação com o manuseio do examinador e a permanência em períodos de cerca de 10 minutos em uma caixa individual com maravalha. Regiões do focinho correspondentes ao coxim

das vibrissas (Figura 6) foram testadas com filamentos de von Frey entre 0,07g e 10g (Touch Test Sensory Evaluator, CA, EUA) (Apêndice 3). Cada filamento foi testado três vezes consecutivas, com intervalo de cerca de 1 segundo. O animal foi considerado responsivo a determinado filamento quando houve nas três tentativas a resposta de retirada de cabeça; a menor força aplicada através dos filamentos de von Frey que evocou este tipo de resposta foi considerada o limiar de resposta mecânica (Meunier et al., 2005; Ren, 1999).

Figura 5. Conjunto de filamentos de von Frey

Figura 6. Vista lateral da cabeça de um rato Wistar evidenciando as vibrissas e o coxim das vibrissas. A área de eleição para o estímulo com os filamentos de von Frey está representada pelo círculo tracejado

4.4 Avaliação do comportamento de ansiedade

Para a avaliação dos níveis de ansiedade, foi utilizado o labirinto em cruz elevado (LCE), um método amplamente aplicado em pesquisas que visam o estudo do comportamento animal em pesquisas experimentais (Pellow et al., 1985). É composto por um labirinto confeccionado em material opaco, elevado do solo 50 cm constituído por dois braços fechados e dois braços abertos, com uma área central livre que permite a movimentação do animal por todos os espaços (Figura 7).

Figura 7. Esquema ilustrativo do labirinto em cruz elevado (Adaptado de <http://www.e-physcience.com/services/behavioral-tests/elevated-plus-maze/>, acesso dia 10/11/2016)

Os animais foram colocados individualmente na área central do labirinto, com a possibilidade de explorar livremente o equipamento por cinco minutos. As sessões experimentais foram monitoradas, gravadas e análises comportamentais foram feitas utilizando-se o programa X-Plot Rat 2005 1.1.0

(FFCLRP-USP – Laboratório Prof. Dr. Silvio Morato de Carvalho). Foram avaliados os seguintes parâmetros:

1. O número de vezes que o animal:

1.1 entrou nos braços abertos do labirinto; registrado considerando como entrada quando o animal atravessava com as quatro patas para dentro desses braços;

1.2 atingiu a extremidade dos braços abertos do labirinto;

1.3 cruzou de um lado para o outro do labirinto pelos braços abertos; considerado quando o animal cruzou com as quatro patas de um lado para o outro;

1.4 realizou o congelamento nos braços fechados; computado quando o animal atingia um estado de paralização de todos os seus movimentos, exceto os movimentos de respiração, se trata de um comportamento de ansiedade em combinação com o medo;

1.5 realizou o esticamento nos braços abertos do labirinto; computado quando o animal estica o corpo inteiro e volta para a posição inicial mantendo as patas traseiras fixas no chão, caracterizando um comportamento exploratório;

1.6 realizou o esticamento em todas as áreas do labirinto;

1.7 realizou o mergulho de cabeça na área central do labirinto; computado quando o animal realizou o movimento exploratório de

cabeça/ombros nas laterais do labirinto em direção ao chão (Anseloni e Brandão, 1997).

2. A porcentagem de tempo que o animal dispendeu

2.1 nos braços abertos do labirinto; obtida através da relação entre o tempo dispendido nos braços abertos do labirinto pelo tempo total do teste (5 minutos);

2.2 nas extremidades dos braços abertos do labirinto; obtida através da relação entre o tempo dispendido nas extremidades dos braços abertos pelo tempo total do teste;

2.3 realizando o congelamento nos braços fechados; obtida através da relação entre o tempo dispendido nesta condição de ansiedade pelo tempo total do teste;

2.4 realizando o esticamento nos braços abertos do labirinto; obtido pelo tempo dispendido realizando este comportamento pelo tempo total do teste;

2.5 realizando o esticamento na área central do labirinto obtido pelo tempo dispendido realizando este comportamento pelo tempo total do teste;

2.6 realizando o mergulho na área central do labirinto; obtido pelo tempo dispendido realizando este comportamento exploratório pelo tempo total do teste.

4.5 Mapeamento do córtex motor de vibrissas e mandíbula

Para o mapeamento, cada animal, independente do grupo, foi anestesiado com a mesma metodologia descrita para a manipulação intra oral (Ítem 4.2). A seguir o animal foi fixado a um estereotáxico Kopf (David Kopf Instruments, CA, EUA). Foram administradas doses de anestésico local (Lidocaína 2%, 1ml/animal, Xylestesin, Cristália, Itapira, SP) no escalpo. Após a tricotomia, foi realizada uma incisão axial mediana com lâmina de bisturi 15. Na região selecionada para estimulação epidural foi feita uma trepanação de 4mm de comprimento e 3mm de largura em ambos os hemisférios (ipsilateral e contralateral à amarrilha), na região correspondente à representação de vibrissas, tomando como referência e ponto zero o bregma (B) (Figura 8).

Figura 8. Craniotomia do animal posicionado no aparelho estereotáxico

Desta forma, a região da trepanação foi de B+3 a B+6 e L+3 a L-3, de acordo com os mapas citoarquitetônicos de Krieg e Paxinos (Krieg, 1946;

Paxinos e Watson, 1986) e com o mapeamento prévio realizado pela equipe (Fonoff et al., 2009b), exemplificado na Figura 9.

Figura 9. Representação esquemática ilustrativa, sem escala, da área abrangida no mapeamento cortical motor. Porção mais anterior do córtex cerebral do rato (Krieg, 1946)

Este mapeamento foi realizado com estimulação elétrica epidural de 1 a 10 volts utilizando-se eletródios bipolares de aço inoxidável com distância de 100µm entre as pontas (Fonoff et al., 2009b). O eletródio, fixado na torre estereotáxica, foi posicionado em contato com a dura-máter e as estimulações foram realizadas a cada 500µm de forma a cobrir toda a área cortical exposta. Com o animal fixo ao estereotáxico, em decúbito ventral e com os membros em uma posição inicial padronizada, foram aplicados os estímulos elétricos fornecidos por um estimulador elétrico (Grass 8800 – Grass Instruments, Quincy, EUA). Em cada ponto do córtex a corrente elétrica foi gradualmente aumentada até ser possível notar uma movimentação mandibular ou de vibrissas, indicando o limiar motor. O examinador permaneceu em uma posição

que permitia a visualização lateral da cabeça do animal. Verificou-se assim a movimentação evocada pela estimulação elétrica dos segmentos corporais atentando para as coordenadas cuja estimulação provocou movimentação das vibrissas e da mandíbula. Foram desconsiderados os movimentos evocados em outras áreas, como olhos e região cervical. Quando nenhum movimento em vibrissas e/ou mandíbula foi evocado até 10V, a região foi considerada não-responsiva.

As respostas motoras de vibrissas e mandíbula correspondentes a cada coordenada foram computadas em uma planilha referenciada pela linha média (Figura 10). Ao final, as planilhas referentes às respostas motoras de cada animal foram avaliadas em conjunto, gerando um mapa de acordo com o grupo. Os resultados foram apresentados pela proporção (%) de animais que tiveram uma resposta motora evocada específica em cada ponto do córtex e comparados entre si.

Figura 10. Mapa cortical motor do rato. A = desenho artístico da porção do córtex motor mapeada em uma visão súpero-inferior. B = Mapa da região cortical motora correspondente à área facial. Os valores correspondem à porcentagem (%) de animais que tiveram movimentos evocados na região corporal correspondente. 0= linha média. De -3 a 0: hemisfério esquerdo. De 0 a 3: hemisfério direito. Codificação: Azul = vibrissas. Verde = mandíbula (valor superior) mais vibrissas (valor inferior). Lacunas em branco sem numeração = áreas que não foram possíveis mapear

Ao final deste experimento foi realizada a eutanásia dos animais.

4.6 Eutanásia

Foi realizada logo após o mapeamento do córtex motor com tiopental (Thiopentax, Cristália, Itapira, SP) diluído em água destilada, intraperitoneal.

4.7 Análise dos dados

Os dados foram tabulados nos programas Excel (Microsoft Office, 2013) e SPSS Statistics 17.0 (IBM, 2008).

A análise de dados foi realizada com os testes de normalidade Kolmogorov-Smirnov, para os dados de peso e sensibilidade mecânica facial, e Shapiro-Wilk, para os dados de comportamento obtidos com o LCE. Para

amostras paramétricas, foi utilizado o teste t de Student e análise de variância (ANOVA) e quando não paramétricas o teste Mann-Whitney e Kruskal-Wallis, todos com significância de 5%.

5 RESULTADOS

Não houve diferença estatística significativa quanto ao peso entre os grupos (Tabela 1 e Tabela 2). Todos os animais ganharam peso de forma semelhante de acordo com o passar do tempo, independente do grupo (Gráfico 1).

Tabela 1. Médias do peso em gramas dos animais dos grupos 14 dias

	Grupo de Estudo 14	Grupo Sham 14	Grupo Controle 14	
Período	(n=7)	(n=7)	(n=6)	p
Baseline	157,14±11,46	153,57±8,24	149,33±6,32	0,841
14 dias	246±8,90	251,29±10,59	255,5±7,86	0,779
28 dias	314,43±13,95	316,57±12,88	345,67±10,43	0,200

Médias ± EPM do peso dos animais. Teste ANOVA, sem diferenças estatísticas

Tabela 2. Médias do peso em gramas dos animais dos grupos 28 dias

	Grupo de Estudo 28	Grupo Sham 28	Grupo Controle 28	
Período	(n=6)	(n=5)	(n=7)	p
Baseline	158,67±13,38	156,4±12,66	151,67±13,38	0,790
14 dias	250,6±17,96	259,6±20,19	262,43±9,05	0,738
28 dias	335,17±22,83	348,8±8,00	329,29±7,05	0,594

Médias ± EPM do peso dos animais. Teste ANOVA, sem diferenças estatísticas

Gráfico 1. Avaliação do peso médio dos animais nos três momentos verificados ao longo do experimento

Teste ANOVA

5.1 Doença Periodontal

No momento do sacrifício, todos os animais do Grupo de Estudo estavam com a amarria adequadamente posicionada no primeiro molar do lado direito. Sinais clínicos condizentes com doença periodontal experimental, principalmente eritema e edema na região foram facilmente visualizados quando comparados os lados ipsilateral e contralateral, além da presença do acúmulo de placa (Figura 11).

Figura 11. Mandíbula dissecada para comparação entre o lado com DP de 14 dias (detalhe) e o saudável

5.2 Sensibilidade mecânica facial no coxim das vibrissas

Não foram observadas diferenças estatísticas significantes quando comparada a sensibilidade mecânica facial no lado direito (ipsilateral) entre os diferentes grupos, nos períodos de 14 e 28 dias (Tabela 3).

Tabela 3. Valores dos limiares de sensibilidade mecânica facial em gramas do lado ipsilateral à indução da DP

Período	Grupo de Estudo	Grupo <i>Sham</i>	Grupo Controle	P
14 dias	1,74±0,25 (n=7)	3,51±1,70 (n=7)	2,36±0,58 (n=6)	0,506
28 dias	1,10±0,65 (n=6)	1,55±0,45 (n=5)	1,49,5±0,32 (n=7)	0,795

Média ± EPM dos valores de sensibilidade facial. DP = Doença periodontal. Teste ANOVA sem diferenças estatísticas significativas

Na Tabela 4 são apresentados os dados sobre a sensibilidade mecânica facial de todos os grupos em todos os períodos estudados. Foram realizadas duas comparações. Na leitura horizontal está a comparação entre os lados ipsilateral e contralateral à indução da DP; houve diferença estatística no lado ipsilateral do Grupo de Estudo aos 28 dias em relação ao lado

contralateral deste mesmo grupo, indicando que nestes animais houve maior sensibilidade no lado doente; não houve diferenças estatísticas para as demais condições. Na leitura vertical encontram-se os valores de p para a comparação entre os períodos de 14 e 28 dias.

Tabela 4. Avaliação da sensibilidade mecânica facial no coxim das vibrissas, em gramas, comparativamente entre os lados ipsilateral e contralateral à indução da DP, aos 14 e 28 dias respectivamente

Grupo de Estudo			
Período	Ipsilateral (Direito)	Contralateral (Esquerdo)	P
14 dias (n=7)	1,74±0,25	5,74±1,53	0,055
28 dias (n=6)	1,10±0,65	3,00±0,44	0,042*
p	0,358	0,143	
Grupo Sham			
Período	Ipsilateral (Direito)	Contralateral (Esquerdo)	P
14 dias (n=7)	3,51±1,70	2,05±0,58	0,364
28 dias (n=5)	1,55±0,45	4,05±2,1	0,278
p	0,421	0,280	
Grupo Controle			
Período	Ipsilateral (Direito)	Contralateral (Esquerdo)	P
14 dias (n=6)	2,36±0,58	2,70±0,64	0,363
28 dias (n=7)	1,49±0,85	2,02±0,41	0,174
p	0,206	0,385	

Média ± EPM dos valores de sensibilidade facial. DP = Doença periodontal. p= Teste t Student (p<0,05)

5.3 Comportamento de ansiedade

Foram verificadas diferenças significantes no Grupo de Estudo entre os tempos 14 e 28 dias para os parâmetros de entrada nas extremidades dos braços abertos, frequência de congelamento nos braços fechados e tempo de esticamento nos braços abertos. Aos 14 dias em média os animais entraram um número menor de vezes na extremidade dos braços abertos e passaram menor tempo realizando a atividade de esticamento nos braços abertos do

labirinto. Estes dados são condizentes com um comportamento mais ansioso. Aos 28 dias, em média os animais passaram mais tempo em congelamento nos braços fechados do labirinto. Não houve diferenças para os demais parâmetros (Tabela 5).

Tabela 5. Parâmetros de ansiedade do labirinto em cruz elevado para o Grupo de Estudo nos dois períodos estudados

Parâmetros do labirinto em cruz elevado	Grupo de Estudo		P
	14 dias (n=7)	28 dias (n=6)	
Entrada nos braços abertos	2,00±0,68	3,17±0,47	0,192
Entrada na extremidade dos braços abertos[∞]	0,33±0,33	1,67±0,494	0,048*
Tempo nos braços abertos (s)	23,65±13,24	41,89±8,90	0,280
Tempo na extremidade dos braços abertos (s)*	10,10±10,10	10,32±3,24	0,948
Cruzamento entre os braços abertos[∞]	6,50±3,28	16,50±4,46	0,099
Tempo de mergulho no centro (s)	3,98±1,33	3,46±1,12	0,960
Congelamento nos braços fechados	5,17±0,94	8,33±0,55	0,016*
Tempo de congelamento braços fechados (s)[∞]	27,93±10,92	21,90±2,33	0,732
Esticamento nos braços abertos	3,00±1,36	7,67±1,90	0,075
Tempo de esticamento braços abertos (s)[∞]	3,50±1,90	11,08±2,71	0,047*
Tempo de esticamento centro (s)	16,18±2,75	17,23±4,74	0,853
Esticamento total[∞]	32,17±2,82	35,33±4,93	0,589

Médias ± EPM. Teste t de Student para amostras independentes para a comparação de médias paramétricas. [∞]Teste Mann-Whitney para comparação de médias não paramétricas. s= segundos *Dado com diferença estatística (p<0,05)

Quando as mesmas variáveis foram comparadas no grupo *Sham* durante os dois períodos de avaliação, não houve diferença estatística (Tabela 6). Nos grupos controle observou-se uma diferença significativa no tempo de esticamento no centro (Tabela 7).

Tabela 6. Parâmetros de ansiedade do labirinto em cruz elevado para o Grupo *Sham* nos dois períodos estudados

Parâmetros do labirinto em cruz elevado	Grupo <i>Sham</i>		p
	14 dias (n=7)	28 dias (n=5)	
Entrada nos braços abertos	2,33±0,80	3,60±1,60	0,474
Entrada na extremidade dos braços abertos[∞]	1,17±0,47	1,80±1,11	0,640
Tempo nos braços abertos (s)	23,04±8,07	40,78±21,23	0,423
Tempo na extremidade braços abertos (s)[∞]	6,98±2,60	10,89±6,69	0,595
Cruzamento entre braços abertos[∞]	12,33±4,88	19,60±10,67	0,527
Tempo de mergulho centro (s)	3,57±1,29	6,72±1,15	0,217
Congelamento nos braços fechados	9,33±2,39	7,80±2,88	0,631
Tempo de congelamento nos braços fechados (s)[∞]	9,17±2,57	19,103±7,42	0,284
Esticamento nos braços abertos	4,33±1,74	5,60±3,17	0,722
Tempo de esticamento nos braços abertos (s)[∞]	6,05±2,54	10,44±6,66	0,525
Tempo de esticamento centro (s)	8,11±2,18	13,92±2,13	0,136
Esticamento total[∞]	28,50±3,67	27,00±2,60	0,624

Média ± EPM. Teste t de Student para médias paramétricas. [∞]Teste Mann-Whitney para médias não paramétricas. s = segundos

Tabela 7. Parâmetros de ansiedade do labirinto em cruz elevado para o grupo Controle nos dois períodos estudados

Parâmetros do labirinto em cruz elevado	Grupo Controle		P
	14 dias (n=7)	28 dias (n=5)	
Entrada nos braços abertos	2,67±0,71	3,57±1,05	0,451
Entrada na extremidade dos braços abertos[∞]	0,50±0,50	2,00±0,73	0,121
Tempo nos braços abertos (s)	29,68±9,54	35,70±12,82	0,570
Tempo na extremidade dos braços abertos (s)[∞]	2,96±2,96	13,83±5,82	0,127
Cruzamento entre os braços abertos[∞]	10,67±4,71	22,00±7,60	0,093
Tempo de mergulho centro (s)	6,51±3,11	8,02±1,51	0,672
Congelamento nos braços fechados	4,5±0,95	5,33±0,55	0,469
Tempo de congelamento nos braços fechados (s)[∞]	8,63±2,84	11,50±1,95	0,437
Esticamento nos braços abertos	6,67±3,14	6,67±2,33	1,000
Tempo de esticamento nos braços abertos (s)[∞]	10,91±4,85	10,58±3,56	0,937
Tempo de esticamento no centro (s)	10,66±3,59	20,47±1,88	0,044*
Esticamento total[∞]	32,00±5,32	36,33±4,11	0,780

Média ± EPM. Teste t de Student para médias paramétricas. [∞]Teste Mann-Whitney para médias não paramétricas. s = segundos. (p<0,05)

A seguir, foi realizada a análise comparativa entre os Grupos de Estudo, *Sham* e Controle para o período 14 dias e 28 dias. No período de 14 dias os animais do Grupo de Estudo passaram mais tempo em congelamento nos braços fechados, comportamento indicativo de ansiedade (Tabela 8). No período de 28 dias não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes (Tabela 9).

Tabela 8. Parâmetros de ansiedade do labirinto em cruz elevado para os Grupos de Estudo, *Sham* e Controle aos 14 dias

Parâmetros do labirinto em cruz elevado	14 dias			P
	Grupo de Estudo (n= 7)	Grupo <i>Sham</i> (n=7)	Grupo Controle (n=6)	
Entrada nos braços abertos	2,00±0,68	2,33±0,80	2,67±0,71	0,804
Entrada na extremidade dos braços abertos[∞]	0,33±0,33	1,17±0,47	0,50±0,50	0,200
Tempo nos braços abertos (s)	23,65±13,24	23,04±8,07	29,68±9,54	0,886
Tempo na extremidade dos braços abertos (s)[∞]	10,10±10,10	6,98±2,60	2,96±2,96	0,295
Cruzamento entre os braços abertos[∞]	6,50±3,28	12,33±4,88	10,67±4,71	0,576
Tempo de mergulho centro (s)	3,98±1,33	3,57±1,29	6,51±3,11	0,574
Congelamento nos braços fechados	5,17±0,94	9,33±2,39	4,50±0,95	0,097
Tempo de congelamento nos braços fechados (s)[∞]	27,93±10,92	9,17±2,57	8,63±2,84	0,031*
Esticamento nos braços abertos	3,00±1,36	4,33±1,74	6,67±3,14	0,513
Tempo de esticamento nos braços abertos (s)[∞]	3,59±1,90	6,05±2,54	10,91±4,85	0,480
Tempo de esticamento no centro (s)	16,18±2,75	8,11±2,18	10,66±3,59	0,167
Esticamento total[∞]	32,17±2,82	28,50±3,67	32,00±5,32	0,419

Média ± EPM. ANOVA para comparação de médias paramétricas. [∞]Teste Kruskal-Wallis para médias não paramétricas. s = segundos. *Dado com diferença estatística (p<0,05)

Tabela 9. Parâmetros de ansiedade do labirinto em cruz elevado para os Grupos de Estudo, *Sham* e Controle aos 28 dias

Parâmetros do labirinto em cruz elevado	28 dias			P
	Grupo de Estudo (n= 6)	Grupo <i>Sham</i> (n=5)	Grupo Controle (n=7)	
Entrada nos braços abertos	3,17±0,47	3,60±1,60	3,67±1,05	0,936
Entrada na extremidade dos braços abertos[∞]	1,67±0,49	1,80±1,11	2,00±0,730	0,944
Tempo nos braços abertos (s)	41,89±8,90	40,78±21,23	36,70±12,82	0,963
Tempo na extremidade dos braços abertos (s)[∞]	10,32±3,24	10,89±6,69	13,83±5,82	0,844
Cruzamento entre os braços abertos[∞]	16,50±4,46	19,60±10,67	22,00±7,60	0,995
Tempo de mergulho no centro (s)	3,46±1,12	6,72±1,15	8,02±1,51	0,060
Congelamento nos braços fechados	7,50±2,37	8,80±0,37	5,33±0,55	0,347
Tempo de congelamento nos braços fechados (s)[∞]	21,90±2,33	19,10±7,42	11,50±1,95	0,134
Esticamento nos braços abertos	7,67±1,90	5,60±3,17	6,67±2,33	0,843
Tempo de esticamento nos braços abertos (s)[∞]	11,08±2,71	10,44±6,66	10,58±3,56	0,775
Tempo de esticamento no centro (s)	17,23±4,74	13,92±2,13	20,47±1,88	0,414
Esticamento total[∞]	35,33±4,93	27,00±2,60	36,33±4,11	0,217

Média ± EPM. ANOVA para comparação de médias paramétricas. [∞]Teste Kruskal-Wallis para médias não paramétricas. s = segundos

5.4 Mapeamento cortical motor de vibrissas e mandíbula

Quatro animais morreram durante os procedimentos para o mapeamento cortical motor: um animal, durante a cirurgia de craniotomia e outros três durante o mapeamento em si.

Os resultados do mapeamento cortical motor da região orofacial foram tabulados graficamente de acordo com os grupos. A seguir (figura 12), o mapa referente ao Grupo de Estudo aos 14 dias.

Figura 12. Mapa do córtex motor dos animais do Grupo de Estudo aos 14 dias (n=6). Os valores correspondem à porcentagem (%) de animais que tiveram movimentos evocados na região corporal correspondente. 0= linha média. De -3 a 0: hemisfério esquerdo. De 0 a 3: hemisfério direito. Codificação: Azul = vibrissas. Verde = mandíbula (valor superior) + vibrissas (valor inferior). Lacunas em branco sem numeração = áreas que não foram possíveis mapear

Na figura 13, o mapa referente ao Grupo de Estudo aos 28 dias.

Figura 13. Mapa do córtex motor dos animais do Grupo de Estudo aos 28 dias (n=6). Os valores correspondem à porcentagem (%) de animais que tiveram movimentos evocados na região corporal correspondente. 0= linha média. De -3 a 0: hemisfério esquerdo. De 0 a 3: hemisfério direito. Codificação: Azul = vibrissas. Verde = mandíbula (valor superior) + vibrissas (valor inferior). Lacunas em branco sem numeração = áreas que não foram possíveis mapear

A seguir, na figura 14, o mapa referente ao Grupo *Sham* aos 14 dias.

Figura 14. Mapa do córtex motor dos animais do Grupo *Sham* aos 14 dias (n=6). Os valores correspondem à porcentagem (%) de animais que tiveram movimentos evocados na região corporal correspondente. 0= linha média. De -3 a 0: hemisfério esquerdo. De 0 a 3: hemisfério direito. Codificação: Azul = vibrissas. Verde = mandíbula (valor superior) + vibrissas (valor inferior). Lacunas em branco sem numeração = áreas que não foram possíveis mapear

Na figura 15, o mapa referente ao Grupo *Sham* aos 28 dias.

Figura 15. Mapa do córtex motor dos animais do Grupo *Sham* aos 28 dias (n=5). Os valores correspondem à porcentagem (%) de animais que tiveram movimentos evocados na região corporal correspondente. 0= linha média. De -3 a 0: hemisfério esquerdo. De 0 a 3: hemisfério direito. Codificação: Azul = vibrissas. Verde = mandíbula (valor superior) + vibrissas (valor inferior). Lacunas em branco sem numeração = áreas que não foram possíveis mapear

Na figura 16, o mapa referente ao Grupo Controle aos 14 dias.

Figura 16. Mapa do córtex motor dos animais do Grupo Controle aos 14 dias (n=5). Os valores correspondem à porcentagem (%) de animais que tiveram movimentos evocados na região corporal correspondente. 0= linha média. De -3 a 0: hemisfério esquerdo. De 0 a 3: hemisfério direito. Codificação: Azul = vibrissas. Verde = mandíbula (valor superior) + vibrissas (valor inferior). Lacunas em branco sem numeração = áreas que não foram possíveis mapear

E finalmente, na figura 17 o mapa referente ao Grupo Controle aos 28 dias.

Figura 17. Mapa do córtex motor dos animais do Grupo Controle aos 28 dias (n=6). Os valores correspondem à porcentagem (%) de animais que tiveram movimentos evocados na região corporal correspondente. 0= linha média. De -3 a 0: hemisfério esquerdo. De 0 a 3: hemisfério direito. Codificação: Azul = vibrissas. Verde = mandíbula (valor superior) + vibrissas (valor inferior). Lacunas em branco sem numeração = áreas que não foram possíveis mapear

Quanto aos movimentos em vibrissas-mais-mandíbula a comparação entre os três grupos respectivamente aos 14 dias da doença periodontal mostra que houve uma diferença significativa no Grupo de Estudo comparativamente ao Grupo Controle (Gráfico 2). Aos 28 dias não houve diferenças estatísticas entre os três grupos.

Gráfico 2. Número de pontos que evocaram movimento de mandíbula-mais-vibrissas de acordo com os grupos e tempo de doença

Representação gráfica das médias $\pm$ EPM do número de pontos que evocaram movimentos de mandíbula mais vibrissas durante o mapeamento cortical motor de acordo com o tempo de doença (14 ou 28 dias). (ANOVA 28 dias; $p=0,349$. *ANOVA 14 dias; $p=0,046$)

Já para os pontos que evocaram movimentos exclusivamente em vibrissas, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes quando aplicado o teste ANOVA tanto aos 14 quanto aos 28 dias (Gráfico 3).

Gráfico 3. Número de pontos que evocaram movimento de vibrissas de acordo com os grupos e tempo de doença

Representação gráfica das médias $\pm$ EPM do número de pontos que evocaram movimentos de vibrissas sem participação da mandíbula durante o mapeamento cortical motor de acordo com o tempo de doença (14 ou 28 dias). DP = Doença Periodontal. (ANOVA 28 dias; $p=0,918$. ANOVA 14 dias; $p=0,211$)

Também foi feita a comparação entre o lado direito (ipsilateral à manipulação intraoral) e o esquerdo (contralateral à manipulação intraoral) do córtex para os pontos que evocaram movimento em mandíbula-mais-vibrissas, sem diferenças estatísticas (Tabela 10 e Tabela 11). Estes dados também estão representados no gráfico 4.

Tabela 10. Comparação entre o lado ipsilateral e lado contralateral à manipulação intraoral para o número de pontos representativos de mandíbula-mais-vibrissas aos 14 dias

Grupos – 14 dias	Hemisfério cerebral		p
	Ipsilateral	Contralateral	
Grupo de Estudo (n=6)	4,17 $\pm$ 1,40	1,17 $\pm$ 0,65	0,137
Grupo Sham (n= 6)	1,17 $\pm$ 0,54	1,67 $\pm$ 0,66	0,611
Grupo Controle (n = 5)	0,80 $\pm$ 0,49	0,60 $\pm$ 0,40	0,778

Média $\pm$ EPM. Teste t de Student pareado

Tabela 11. Comparação entre o lado ipsilateral e o lado contralateral à manipulação intraoral para os pontos representativos de mandíbula-mais-vibrissas aos 28 dias

Grupos – 28 dias	Hemisfério cerebral		p
	Ipsilateral	Contralateral	
Grupo de Estudo (n=6)	0,67±0,42	2,17±0,74	0,060
Grupo Sham (n= 5)	0,60±0,40	1,00±0,44	0,178
Grupo Controle (n = 6)	0,50±0,34	0,67±0,42	0,771

Média ± EPM. Teste t de Student pareado. DP = Doença Periodontal

Gráfico 4. Número de pontos no hemisfério ipsilateral e contralateral que evocaram movimento de mandíbula-mais-vibrissas de acordo com os grupos e tempo de doença

Representação gráfica das médias ± EPM do número de pontos que evocaram movimentos de mandíbula-mais-vibrissas durante o mapeamento cortical motor de acordo com o hemisfério cerebral, grupo e tempo de doença (14 ou 28 dias). Teste t de Student pareado. (Grupo de Estudo 14 dias, $p=0,137$; Grupo Sham 14 dias, $p=0,611$; Grupo Controle 14 dias, $p=0,778$; Grupo de Estudo 28 dias, $p=0,060$; Grupo Sham 28 dias, $p=0,178$; Grupo Controle, $p=0,771$)

A seguir, foi realizada a comparação aos 14 e 28 dias da DP, em relação ao número de pontos que evocaram movimentos em mandíbula mais vibrissas do lado ipsilateral (Gráfico 5) e contralateral (Gráfico 6). Houve

diferença estatisticamente significativa no Grupo de Estudo entre 14 e 28 dias no lado ipsilateral ($p=0,038$), indicando que aos 14 dias houve um aumento da representação quando comparado aos animais doentes com 28 dias de evolução. Os demais valores de p se encontram nos gráficos a seguir.

Gráfico 5. Número de pontos no hemisfério ipsilateral que evocaram movimento de mandíbula-mais-vibrissas

Representação gráfica das médias $\pm$ EPM do número de pontos que evocaram movimentos de mandíbula-mais-vibrissas durante o mapeamento cortical motor do lado ipsilateral. Teste t de Student. (*Grupo de Estudo, $p=0,038$; Grupo Sham, $p=0,439$; Grupo Controle, $p=0,618$)

Gráfico 6. Número de pontos no hemisfério contralateral que evocaram movimento de mandíbula-mais-vibrissas

Representação gráfica das médias $\pm$ EPM do número de pontos que evocaram movimentos de mandíbula mais vibrissas durante o mapeamento cortical motor do lado contralateral. Teste t de Student. (Grupo de Estudo, $p=0,338$; Grupo *Sham*, $p=0,448$; Grupo Controle, $p=0,912$)

6 DISCUSSÃO

6.1 Indução da Doença Periodontal

Através do modelo experimental utilizado neste estudo (colocação da amarria ao redor do primeiro molar inferior direito), foi possível a indução da doença periodontal com sinais clínicos bem evidentes, como edema, eritema e sangramento gengival. Da Silva e colaboradores (2008) sugeriram aguardar entre 7 a 14 dias para a indução da doença. Breivik e colaboradores em 2002 aguardaram 14 e 49 dias. Já o período de 30 dias foi escolhido por Cavagni e colaboradores (2005) e por Peruzzo e colaboradores (2010). Portanto, apesar de não haver homogeneidade na literatura científica a respeito do tempo de espera para a indução da doença periodontal, pode-se dizer que o tempo de 14 ou 28 dias utilizado no presente trabalho foi adequado tanto para a observação de animais com DP de início mais recente quanto tardio ou crônico.

A DP não comprometeu o ganho de peso dos animais ($p=0,594$), estando de acordo com outros estudos que também não observaram diferenças de peso entre os animais em que foi induzida, de outros sem a mesma (Cavagni et al., 2005; Peruzzo et al., 2010). Este resultado pode ser considerado compatível com a experiência clínica que mostra que os pacientes com DP passam a queixar-se quando a doença evoluiu cronicamente. Nesta fase avançada há perda do osso de sustentação, impacção de alimentos, dificuldade de higiene oral, eventual mobilidade dentária, sangramento, dor, principalmente na agudização da doença, entre outros sintomas. É possível

que possa haver um ganho menor de peso, ou mesmo uma perda do mesmo, em fase mais avançada da DP, entretanto, não foi o motivo deste estudo.

6.2 Sensibilidade mecânica facial no coxim das vibrissas

De acordo com a literatura pesquisada, este foi o primeiro estudo que realizou a avaliação da nocicepção em vibrissas de ratos com indução de DP em modelo experimental, ou seja, de uma inflamação crônica oral. Os estudos experimentais encontrados na literatura em geral avaliam a patogênese da doença (Rovin et al., 1966; da Silva et al., 2008; Struillou et al., 2010) bem como algumas alterações sistêmicas envolvidas, como alterações no eixo HPA (Breivik et al., 2001b), expressão de genes relacionados à IL-1 durante o início e progressão da inflamação (Ebersole et al., 2014) e alterações centrais provenientes do metabolismo deficiente de glicose pelo cérebro (Ilievsky et al., 2016).

O método utilizado nesta pesquisa já foi descrito na literatura para estudo do modelo de dor neuropática trigeminal (Meunier et al., 2005). Portanto a padronização utilizada no presente estudo procurou avaliar uma área que estivesse um pouco mais distante do local em que foi induzida a doença periodontal (molar inferior). Esta pode ser considerada uma limitação do estudo, já que avaliar a sensibilidade mecânica intra ou extra oral na região da doença periodontal poderia fornecer informações adicionais.

Embora não tenha havido diferença estatística entre o grupo de estudo e os demais, tanto aos 14 como aos 28 dias da indução da DP, houve diferença estatística significativa na sensibilidade mecânica entre o lado direito

– doente- e o lado esquerdo – saudável- dos animais do Grupo de Estudo aos 28 dias ($p=0,042$). Esta diferença não foi encontrada nos animais dos Grupos *Sham* e Controle ($p=0,278$ e $0,174$ respectivamente). Para os animais do Grupo de Estudo aos 14 dias da indução da DP não houve diferença estatística, entretanto foi observada uma tendência ($p=0,055$). É possível que a DP experimental induzida em apenas um dente não tenha sido o bastante para causar alterações centrais com uma manifestação periférica mais exuberante aos 14 dias do experimento. A diferença encontrada aos 28 dias na sensibilidade mecânica no lado afetado pela doença sugere que a cronicidade possa ter um papel importante neste fenômeno, associada ao fato de ter sido induzido em um único dente, pois alguns poucos estudos clínicos com pacientes mostram que na DP crônica há uma maior queixa de dor difusa na região crânio-facial que reduz ou cessa após o tratamento periodontal com uma possível mediação do óxido nítrico neste processo (Fabri et al., 2009; Fabri et al., 2014b). Entretanto os resultados do presente estudo devem ser interpretados com cautela e mais estudos serão necessários para avaliar a relação DP, número de dentes afetados e nocicepção.

Estudos experimentais com indução da DP acometendo maior número de dentes podem ser úteis para confirmar os dados observados neste estudo preliminar dos desfechos da DP experimental.

6.3 Comportamento de ansiedade

Através da análise da performance do Grupo Estudo no LCE, observamos que os animais com 14 dias de doença se mostraram mais ansiosos que os animais com 28 dias de doença. Isto se tornou evidente aos

14 dias nas diferenças estatísticas significantes encontradas para o parâmetro clássico de chegada na extremidade dos braços abertos ($p=0,048$) e para o comportamento de esticamento nos braços abertos ($p=0,047$). O número de entradas e o tempo dispendido nos braços abertos e em suas extremidades configuram medidas clássicas de ansiedade, enquanto o esticamento é uma medida etológica relacionada com a exploração do novo ambiente pelo animal, que neste caso foram menores quando comparado aos animais com 28 dias de doença. Estes dados conferem mais um alicerce para a ideia de que a inflamação periodontal e o comportamento podem ser interdependentes. Em estudo experimental sobre a correlação entre dor inflamatória na pata dos animais e o desempenho dos mesmos no LCE também houve correlação estatística (Parent et al., 2012). Portanto o presente estudo sugere que isto também ocorre na doença periodontal.

Outro dado relevante do estudo atual refere-se à diferença estatística significativa, aos 14 dias de doença, nos animais do Grupo de Estudo quando comparados aos animais dos Grupos Sham e Controle, quanto ao congelamento nos braços fechados ($p=0,031$), reforçando as alterações anteriores já discutidas. O congelamento nos braços fechados expressa o comportamento aumentado de estresse e de medo dos animais (Bolles e Collier, 1976). O conjunto destes dados sobre a ansiedade animal indica que aos 14 dias da indução da DP já há alguma alteração no comportamento dos animais.

Já os animais com 28 dias de doença periodontal, quando comparados aos animais com 14 dias demonstraram comportamento mais

condizente com o medo. O que se pode verificar através da diferença estatística significativa quanto ao congelamento nos braços fechados ($p=0,016$). Outra hipótese é correlacionada à dor, que ativaria circuitos pré motores aumentando o congelamento (Sewards e Sowards, 2003). Isto está evidente neste grupo de animais em que o lado doente apresentou um limiar nociceptivo menor que o lado saudável ($p=0,042$), um possível indicador do estado de dor destes animais.

Alguns estudos correlacionam o quadro sustentado de estresse e ansiedade ao aumento da suscetibilidade do indivíduo a inflamações corpóreas devido às alterações no sistema neuroimunológico (Wrona, 2006; Gameiro et al., 2006). Numa via de mão dupla, a DP com 14 dias da indução, que apresenta características mais agudas, pode ser a explicação do quadro de ansiedade destes animais, uma vez que a sinalização das citocinas no cérebro influencia no controle do comportamento e humor – através do eixo HPA. Embora esta correlação entre DP e ansiedade seja um dado novo na literatura, o mecanismo do mesmo pode ser explicada pelo eixo HPA, como já foi demonstrada que a DP influencia esta via (Breivik et al 2001,b). Pode ser que as citocinas provenientes da DP com 14 dias de evolução tenham atuado junto ao sistema dopaminérgico causando as alterações de ansiedade observadas nos animais de 14 dias (Garcia et al., 2005), mas não aos 28 dias de doença.

Não foram observadas diferenças estatísticas entre os animais Sham e Controle, demonstrando uma homogeneidade entre os grupos.

Clinicamente, sabemos que o estresse e a ansiedade dos pacientes se relacionam com a presença de dor crônica pós-operatória e podem interferir

negativamente na recuperação dos doentes e sua resposta ao tratamento (Vickers, et al., 2006; Theunissen, et al., 2012). Experimentalmente poucos são os estudos que avaliaram estes fatores de estresse e ansiedade associados a quadros de inflamação. O fato de que a DP com 14 dias de indução, uma inflamação aguda com fortes características imunológicas, também foi capaz de desencadear comportamentos de ansiedade no LCE, pode indicar um novo caminho para o estudo da correlação entre inflamação periodontal, nocicepção e ansiedade.

Um estudo experimental em animais sob indução de DP baseou-se em testes bioquímicos do plasma ou do sangue para avaliar o estresse dos animais (Breivik et al, 2001b). Neste estudo optamos por um modelo etológico onde o comportamento do animal pode ser avaliado objetivamente. Este modelo tem sido utilizado em estudos para avaliar a ansiedade de animais submetidos à dor e inflamação, entretanto, no nosso conhecimento, é a primeira vez que é utilizado em um modelo de dor inflamatória orofacial. Testes bioquímicos do plasma para avaliar a ansiedade também poderiam contribuir para reforçar os dados obtidos neste estudo, entretanto não foram o objetivo deste.

6.4 Mapeamento cortical motor de vibrissas e mandíbula

Este é o primeiro estudo, de acordo com a literatura consultada, que buscou avaliar as alterações neuroplásticas motoras em animais com DP experimental. Durante o mapeamento motor dos animais deste estudo foi observada uma sobreposição de áreas corticais que quando estimuladas evocaram movimentos em vibrissas e mandíbula simultaneamente. Este

achado do presente estudo contemplou todos os animais independente dos grupos, porém de forma mais sutil nos animais do grupo controle, que não haviam passado por qualquer tipo de manipulação intraoral. Isto está de acordo com o descrito anteriormente, em que houve uma sobreposição dos dentes na porção mais anterior da área cortical dos barris das vibrissas, porém com uma predominância contralateral, algo que não foi visualizado no presente estudo (Hayama et al, 1993). O estudo das vibrissas foi impulsionado pelo fato de que os ratos utilizam estes órgãos de forma especializada para sua localização espacial e locomoção (Feldman e Brecht, 2005). Apesar de haver o cruzamento das vias trigeminais ascendentes, também foi observado na literatura a presença de estudos que demonstraram que a estimulação de uma única vibrissa pode induzir respostas no córtex ipsilateral e contralateral (Feldman e Brecht, 2005; Krieg, 1946). Isto está de acordo com um estudo clínico que também não evidenciou características contralaterais no mapeamento cortical de pacientes com dor aguda dentária (Jantsch et al., 2005), bem como os achados do presente estudo.

Estudos anteriores do grupo já haviam mostraram em modelo animal que há uma grande área representativa das vibrissas no mapa cortical motor, embora não fosse contemplada a representação da mandíbula (Fonoff et al., 2009). No presente estudo, a posição do examinador possibilitou a visualização do movimento da mandíbula, a qual nem sempre é fácil de ser observada complementando, portanto, a informação aos estudos anteriores. Além disto, este estudo realizou uma comparação entre animais saudáveis e aqueles que apresentavam uma doença inflamatória oral.

A escolha do dente molar do rato Wistar para a indução da DP neste estudo se deu por ser o dente fisiologicamente mais semelhante aos dentes humanos (Da Silva et al., 2008). Porém, existem evidências de que os mecanorreceptores dos dentes molares funcionam de forma diferente dos mecanorreceptores dos dentes incisivos nestes animais (Ishii et al., 2002). Talvez, o desenvolvimento da DP nos dentes incisivos inferiores poderia trazer algum resultado diferente na questão do mapeamento cortical.

Deste modo, observamos que aos 14 dias da indução da DP houve uma diferença estatisticamente significativa no mapeamento cortical dos animais de Grupo de Estudo, em comparação com o grupo controle ($p=0,046$), no que se refere ao movimento associado de vibrissas mais mandíbula. Esta diferença também é observada quando comparado o lado ipsilateral a doença nos Grupo de Estudo de 14 dias com o Grupo de Estudo de 28 dias ($p=0,038$), parecendo haver, portanto, uma adaptação do córtex motor após a cronificação da DP. Existe na literatura a dúvida do quão mínimo pode ser o estímulo periférico capaz de iniciar uma alteração, ou reorganização, nos mapas corticais (Xerri, 2008). Observamos no presente estudo que na região orofacial, a indução da DP em um único dente foi o suficiente para, em 14 dias, ocasionar uma reorganização do mapa motor. Outro estudo experimental em que realizaram o mapeamento do M1 também mostra que as alterações neuroplásticas ocorrem em torno dos 14 dias após a indução da alteração periférica, neste caso, alteração da dimensão vertical de oclusão (Kato et al., 2012). Estudo clínico em humanos demonstrou alterações na representação cortical motora também em torno de 14 dias após o tratamento de uma

condição dolorosa (Lickteig et al., 2013). Estes estudos sugerem que as alterações neuroplásticas corticais motoras decorrentes de alterações periféricas orofaciais são mais acentuadas na fase inicial, havendo posteriormente uma adaptação à medida que há a cronificação do fator periférico. Isto pode significar que as alterações neuroplásticas orofaciais podem variar de acordo com o tempo, ficando menos evidentes após o período de adaptação ou tratamento da condição patológica. Nos animais do Grupo de Estudo aos 14 e 28 dias foi observado um aumento da região cortical rostro-lateral com sobreposição representativa das vibrissas e da mandíbula não necessariamente contíguas. Estes dados estão de acordo com o estudo de Franchi (2000) que demonstrou alterações dos mapas corticais motores após manipulação do nervo facial.

Apesar da metodologia utilizada em outro estudo do grupo propor um mapeamento com 250µm de espaço entre um ponto e outro (Fonoff et al., 2009), neste optou-se por um espaçamento de 500µm, uma vez que este mapeamento seria bilateral, demandando maior tempo operatório. Mapeamentos por ICMS com distância de 500µm entre os pontos são comuns na literatura (Franchi, 2000; Avivi-Arber et al, 2010; Kato et al., 2012).

Em geral estudos experimentais sobre sensibilização central e atividade do córtex motor utilizam EMG para quantificar os movimentos mandibulares (Adachi et al., 2008; Avivi-Arber et al., 2010; Kato et al., 2012) o qual não foi utilizado no presente estudo, pois o mesmo baseou-se na visualização direta do observador. Este método foi escolhido por já ter sido utilizado em trabalhos anteriores (Fonoff et al., 2009) permitindo a visualização

tanto das vibrissas quanto dos movimentos mandibulares, pois neste caso não foi o objetivo neste estudo identificar os músculos específicos envolvidos, mas apenas a presença dos movimentos mandibulares. Como o córtex motor recebe informações somatosensitivas de toda a região orofacial, é possível também utilizar o mapeamento do M1 para observar o desfecho de alterações em dentes. Assim, o presente estudo avaliou a representação motora da mandíbula, área adjacente aos dentes e que pode ser acometida nestes casos devido à hiperalgesia secundária (Sacerdote e Levrini, 2012).

6.5 Considerações finais

Embora os modelos experimentais da DP sejam bastante utilizados em estudos sobre a patogênese da mesma, a sua correlação com a neuroplasticidade motora através do mapeamento cortical usando a estimulação elétrica transdural, e também sua relação com a ansiedade, estresse e medo através de modelos etológicos que permitem a visualização do comportamento do animal não tem sido utilizados para estudar esta doença. Ao tentar elucidar estas questões a respeito da interação entre diferentes áreas complexas relacionadas experimentalmente e clinicamente, levantou-se outras perguntas a serem respondidas. Este enfoque para o estudo da DP mostra que o modelo é viável. Como a DP geralmente instala-se de modo gradual, suas alterações crônicas nem sempre se manifestam por sintomas dolorosos claramente perceptíveis pelo paciente. Assim, os dados deste estudo, embora estatisticamente sutis, sugerem o envolvimento da doença periodontal experimental, também nas áreas de dor e de comportamento. Estudos deste tipo são necessários já que a DP grave é altamente prevalente na população

mundial e ainda é uma morbidade silenciosa associada à muitas doenças sistêmicas crônicas. Acreditamos que o mapeamento do córtex motor, através da estimulação elétrica transdural, das estruturas orofaciais é uma ferramenta interessante para o estudo das diversas mudanças que acontecem na cavidade bucal, relacionadas a alterações periféricas que ocorrem durante as doenças bucais e tratamentos odontológicos, causando muitas vezes desconforto e dor. Com o estudo de como e quando ocorrem essas alterações neuroplásticas em SNC e alterações de comportamento relacionadas à ansiedade e estresse estamos mais aptos a compreender e tratar as queixas dos pacientes de forma mais abrangente e satisfatória, principalmente daqueles que têm dor crônica.

7 CONCLUSÕES

Pela metodologia aplicada concluímos que aos 14 dias da DP houve uma expansão, à estimulação elétrica transdural, da resposta motora ipsilateral de vibrissas-mais-mandíbula; e também houve alterações no comportamento sugestivas de ansiedade dos animais.

8 REFERÊNCIAS

- Adachi, K, Murray, GM, Lee, JC, Sessle, BJ. Noxious lingual stimulation influences the excitability of the face primary motor cerebral cortex (face MI) in the rat. *J Neurophysiol*. 2008;100(3):1234-44.
- Alvarez, FK, de Siqueira, SR, Okada, M, Teixeira, MJ, Siqueira, JT. Evaluation of the sensation in patients with trigeminal post-herpetic neuralgia. *J Oral Pathol Med*. 2007;36(6):347-50.
- Anseloni, VZ, Brandão, ML. Ethopharmacological analysis of behavior of rats using variations of the elevate plus-maze. *Behav Pharmacol*. 1997;8:533-40.
- Armitage, GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol*. 1999;4(1):1-6.
- Avital, A, Goshen, I, Kamsler, A, Segal, M, Iverfeldt, K, Richter-Levin, G, et al. Impaired interleukin-1 signaling is associated with deficits in hippocampal memory processes and neural plasticity. *Hippocampus*. 2003;13(7):826-34.
- Avivi-Arber, L, Lee, JC, Sessle, BJ. Effects of incisor extraction on jaw and tongue motor representations within face sensorimotor cortex of adult rats. *J Comp Neurol*. 2010;518(7):1030-45.
- Ayub, LG, Novaes-Júnior, AB, Grisi, MFM, Souza, SLS, Palioto, DB, Leite-Panissi, CRA, et al. Estresse como possível fator de risco para a Doença Periodontal - Revisão de Literatura. *R Periodontia*. 2010;20(03):28-36.
- Benatti, C, Alboni, S, Montanari, C, Caggia, F, Tascetta, F, Brunello, N, et al. Central effects of a local inflammation in three commonly used mouse strains with a different anxious phenotype. *Behav Brain Res*. 2011;224(1):23-34.
- Bergamini, MR, Kabadayan, F, Bernardi, MM, Suffredini, IB, Ciaramicoli, MT, Kodama, RM et al. Stress and its role in the dentin hypersensitivity in rats. *Arch Oral Biol*. 2017;73:151-60.
- Bolles, RC, Collier, AC. The effect of predictive cues on freezing in rats. *Animal Learning & Behavior*. 1976;4(1A):6-8.
- Brasil, MS. Pesquisa Nacional de Saúde Bucal - 2010 - Nota para imprensa: Ministério da Saúde; 2010 [updated 2010; Acesso em: 2012 07 de junho]; Disponível em: [http://www.idisa.org.br/img/File/SAUDE%20BUCAL--NotaParaImprensa-28dez2010%20\(2\).pdf](http://www.idisa.org.br/img/File/SAUDE%20BUCAL--NotaParaImprensa-28dez2010%20(2).pdf).

Breivik, T, Thrane, PS, Gjermo, P, Fonnum, F. Postnatal glutamate-induced central nervous system lesions alter periodontal disease susceptibility in adult Wistar rats. *J Clin Periodontol*. 2001a;28:904-9.

Breivik, T, Thrane, PS, Gjermo, P, Opstad, PK, Pabst, R, von-Hoersten, S. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation by experimental periodontal disease in rats. *J Periodont Res*. 2001b;36:295-300.

Breivik, T, Thrane, PS, Cools, A, Myhrer, T. Effects of hippocampal lesioning on experimental periodontitis in Wistar rats. *J Periodont Res*. 2002;37:360-5.

Buonomano, DV, Merzenich, MM. Cortical Plasticity: From Synapses to Maps. *Annu Rev Neurosci*. 1998;21:149-86.

Byers, MR, O'Connor, TA, Martin, RF, Dong, WK. Mesencephalic trigeminal sensory neurons of cat: axon pathways and structure of mechanoreceptive endings in periodontal ligament. *J Com Neurol*. 1986;250:181-91.

Byers, MR, Narhi, MV. Dental injury models: experimental tools for understanding neuroinflammatory interactions and polymodal nociceptor functions. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1999;10(1):4-39.

Catania, KC, Remple, MS. Somatosensory cortex dominated by the representation of teeth in the naked mole-rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(8):5692-7.

Cavagni, J, Soletti, AC, Gaio, EJ, Rösing, CK. The effect of dexamethasone in the pathogenesis of ligature-induced periodontal disease in Wistar rats. *Braz Oral Res*. 2005;19(4):290-4.

da Silva, AEB, Lopes, JR, Storrer, CM. Estudo Histológico de Indução da Periodontite com Ligaduras em um Modelo Animal - Projeto Piloto. *RUBS*. 2008;1(3):70-5.

de Siqueira, SR, Vilela, TT, Florindo, AA. Prevalence of headache and orofacial pain in adults and elders in a Brazilian community: an epidemiological study. *Gerodontology*. 2015;32(2):123-131.

Grossman, E, Siqueira, JTT, de Siqueira, SRDT. Orofacial neuropathic pain. *Rev Dor*. 17(Suppl1):S75-8.

Ebersole, JL, Kirakodu, S, Novak, MJ, Stromberg, AJ, Shen, S, Orraca, L, et al. Cytokine gene expression profiles during initiation, progression and resolution of periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2014;41(9):853-61.

Fabri, GMC, Siqueira, SR, Simione, C, Nasri, C, Teixeira, MJ, Siqueira, JT. Refractory craniofacial pain: is there a role of periodontal disease as a comorbidity? *Arq Neuropsiquiatr*. 2009;67(2B):474-9.

Fabri, GMC, Savioli, C, Tesseroli Siqueira, JT. Periodontal Treatment and Quality of Life of Chronic Facial Pain Patients. *Int. J. Odontostomat.* 2014a;8(2):247-252.

Fabri, GMC, Sannomiya, P, Prado, CM, Leick-Maldonado, EA, Siqueira, SRDT, Tibério, IFC, et al. The expression of nitric oxide in the gingival tissue in subjects with periodontitis and chronic pain. *Int. J. Odontostomat.* 2014b;8(2):279-287.

Fabri, GMC, Savioli, C, Siqueira JT, Campos, LM, Bonfá, E, Silva, CA. Periodontal disease in pediatric rheumatic diseases. *Rev. Bras. Reumatol.* 2014c;54(4):311-317.

Feldman, DE, Brecht, M. Map plasticity in somatosensory cortex. *Science.* 2005;310(5749):810-5.

Fernandes, EG, Savioli, C, Siqueira, JT, Silva, CA. Oral health and the masticatory system in juvenile systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2007;16(9):713-9.

Ferreira, SH, Ferrari, LF, Cunha, TM, Nascimento, PGBD, Verri-Jr, WA, Cunha, FQ. *Dor Inflamatória*. Dor: Princípios e Práticas: ArtMed; 2009.

Fonoff, ET, Dale, CS, Pagano, RL, Paccola, CC, Ballester, G, Teixeira, MJ, et al. Antinociception induced by epidural motor cortex stimulation in naive conscious rats is mediated by the opioid system. *Behav Brain Res.* 2009a;196:63-70.

Fonoff, ET, Pereira, JF, Jr., Camargo, LV, Dale, CS, Pagano, RL, Ballester, G, et al. Functional mapping of the motor cortex of the rat using transdural electrical stimulation. *Behav Brain Res.* 2009b;202(1):138-41.

Franchi, G. Reorganization of vibrissal motor representation following severing and repair of the facial nerve in adult rats. *Exp Brain Res.* 2000;131(1):33-43.

Gameiro, GH, Gameiro, PH, Andrade Ada, S, Pereira, LF, Arthuri, MT, Marcondes, FK, et al. Nociception- and anxiety-like behavior in rats submitted to different periods of restraint stress. *Physiol Behav.* 2006;87:643-9.

Gao, YJ, Ji, RR. Chemokines, neuronal-glial interactions, and central processing of neuropathic pain. *Pharmacol Ther.* 2010;126(1):56-68.

Garcia, AMB, Martinez, R, Brandão, ML, Morato, S. Effects of apomorphine on rat behavior in the elevated plus-maze. *Physiol Behav.* 2005;85:440-7.

Gardner, EP, Martin, JH. *Coding of Sensory Information*. In: Kandel, ER, Schwartz, JH, Jessel, TM, editors. Principles of Neuroscience. New York: McGraw-Hill; 2000.

Grace, PM, Rolan, PE, Hutchinson, MR. Peripheral immune contributions to the maintenance of central glial activation underlying neuropathic pain. *Brain Behav Immun.* 2011;25(7):1322-32.

Hayama, T, Hashimoto, K, Ogawa, H. Projection of the inferior dental nerve to the primary somatosensory cortex in rats. *Neurosci Lett.* 1993;164(1-2):13-6.

Henry, EC, Marasco, PD, Catania, KC. Plasticity of the cortical dentition representation after tooth extraction in naked mole-rats. *J Comp Neurol.* 2005;485(1):64-74.

Ilievsky, V, Kinchen, JM, Prabhu, R, Rim, F, Leoni, L, Unterman, TG, et al. Experimental periodontitis results in prediabetes and metabolic alterations in brain, liver and heart: global untargeted metabolomics analyses. *J Oral Biol (Northborough).* 2016;3(1): Author manuscript; available in PMC 2016 July 05.

Ishii, N, Soma, K, Toda, K. Response properties of periodontal mechanoreceptors in rats, in vitro. *Brain Res Bull.* 2002;58(4):357-61.

Jantsch, HH, Kemppainen, P, Ringler, R, Handwerker, HO, Forster, C. Cortical representation of experimental tooth pain in humans. *Pain.* 2005;118(3):390-9.

Jung, H, Horiuchi, M, Soma, K. Changes in the distribution of nerve fibers immunoreactive to calcitonin gene-related peptide according to growth and aging in rat molar periodontal ligament. *Angle Orthod.* 2010;80(2):309-15.

Kamer, AR, Craig, RG, Dasanayake, AP, Brys, M, Glodzik-Sobanska, L, de Leon, MJ. Inflammation and Alzheimer's disease: possible role of periodontal diseases. *Alzheimers Dement.* 2008;4(4):242-50.

Kandel, ER. *Nerve Cells and Behavior.* In: Kandel, ER, Schwartz, JH, Jessel, TM, editors. Principles of neuroscience. New York: McGraw-Hill; 2000.

Kato, C, Fujita, K, Kokai, S, Ishida, T, Shibata, M, Naito, S, et al. Increased occlusal vertical dimension induces cortical plasticity in the rat face primary motor cortex. *Behav Brain Res.* 2012;228(2):254-60.

Klineberg, I, Murray, G. Osseoperception: sensory function and proprioception. *Adv Dent Res.* 1999;13:120-9.

Krieg, WJS. Connections of the cerebral cortex. I. The albino rat. A topography of cortical areas. *J Comp Neurol.* 1946;84:221-75.

Lang, N, Mombelli, A, Attstrom, R. *Dental Plaque and Calculus.* In: Lindhe, J, Karring, T, Lang, N, editors. Clinical Periodontology and Implant Dentistry. Oxford: Blackwell Munksgaard; 2003. p. 81-98.

Leite-Almeida, H, Cerqueira, JJ, Wei, H, Ribeiro-Costa, N, Anjos-Martins, H, Sousa, N, et al. Differential effects of left/right neuropathy on rats' anxiety and cognitive behavior. *Pain*. 2012;153(11):2218-25.

Liberman, DN, Pilau, RM, Orlandini, LF, Gaio, EJ, Rösing, CK. Comparison of two methods for alveolar bone loss measurement in an experimental periodontal disease model in rats. *Braz Oral Res*. 2010;25(1):80-4.

Lickteig, R, Lotze, M, Kordass, B. Successful therapy for temporomandibular pain alters anterior insula and cerebellar representations of occlusion. *Cephalalgia*. 2013;33(15):1248-57.

Lindhe, L, Karring, T, Araújo, M. *Anatomia do Periodonto*. Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral: Guanabara Koogan; 2010. p. 20-49.

Lundy, FT, Mullally, BH, Burden, DJ, Lamey, PJ, Shaw, C, Linden, GJ. Changes in substance P and neurokinin A in gingival crevicular fluid in response to periodontal treatment. *J Clin Periodontol*. 2000;27(7):526-30.

Lundy, F, Linden, G. Neuropeptides and neurogenic mechanisms in oral and periodontal inflammation. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004;15:856-8.

Maeda, T, Ochi, K, Nakakura-Ohshima, K, Youn, SH, Wakisaka, S. The Ruffini ending as the primary mechanoreceptor in the periodontal ligament: its morphology, cytochemical features, regeneration, and development. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1999;10(3):307-27.

Merskey, H, Bogduk, N. *Classification of Chronic Pain*. IASP Press; 1994.

Meunier, A, Latremoliere, A, Mauborgne, A, Bourgoin, S, Kayser, V, Cesselin, F, et al. Attenuation of pain-related behavior in a rat model of trigeminal neuropathic pain by viral-driven enkephalin overproduction in trigeminal ganglion neurons. *Mol Ther*. 2005;11(4):608-16.

Mombelli, A. *O Uso de Antibióticos na Terapia Periodontal*. Tratado de Periodontia Clínica e Implantodontia Oral: Guanabara-Koogan; 2010. p. 494-507.

Nasri-Heir, C, Zagury, JG, Thomas, D, Anathan, S. Burning mouth syndrome: Current concepts. *J Indian Prosthodont Soc*. 2015;15(4):300-7.

Parent, AJ, Beaudet, N, Beaudry, H, Bergeron, J, Berube, P, Drolet, G, et al. Increased anxiety-like behaviors in rats experiencing chronic inflammatory pain. *Behav Brain Res*. 2012;229(1):160-7.

Paxinos, G, Watson, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 2ªed. New York Academic Press; 1986.

Pellow, S, Chopin, P, File, SE, Briley, M. Validation of open-closed arm entries in the elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*. 1985;14:149-67.

Peruzzo, DC, Benatti, BB, Andersen, ML, Tufik, S, Casati, MZ, Nociti-Jr, FH. Evidence that metyrapone in the presence of inflammation modulates cytokine mRNA expression. *Cytokine*. 2010;52:184-9.

Reis, C, Da Costa, AV, Guimaraes, JT, Tuna, D, Braga, AC, Pacheco, JJ, et al. Clinical improvement following therapy for periodontitis: Association with a decrease in IL-1 and IL-6. *Exp Ther Med*. 2014;8(1):323-7.

Remple, MS, Henry, EC, Catania, KC. Organization of somatosensory cortex in the laboratory rat (*Rattus norvegicus*): Evidence for two lateral areas joined at the representation of the teeth. *J Comp Neurol*. 2003;467(1):105-18.

Ren, K. An improved method for assessing mechanical allodynia in the rat. *Physiol Behav*. 1999;67(5):711-6.

Rolim, TS, Fabri, GMC, Nitrini, R, Aghinah, R, Teixeira, MJ, Siqueira, JTT, et al. Evaluation of patients with Alzheimer's disease before and after dental treatment. *Arq Neuropsiquiatr*. 2014;72(12):919-24.

Rossa-Júnior, C, Oliveira, AC, Holzhausen, M, Rossa, EGO. Associação entre nível de estresse psicológico e as condições clínicas do periodonto. *ClipeOdonto-UNITAU*. 2009;1(1):43-7.

Rovin, S, Costich, ER, Gordon, HA. The influence of bacteria and irritation in the initiation of periodontal disease in germfree and conventional rats. *J Periodont Res*. 1966;1:193-203.

Rutsatz, C, Baumhardt, SG, Feldens, CA, Rosing, CK, Grazziotin-Soares, R, Barletta, FB. Response of pulp sensibility test is strongly influenced by periodontal attachment loss and gingival recession. *J Endod*. 2012;38(5):580-3.

Rylander, H, Lindhe, L. *Terapia Periodontal*. Tratado de Periodontia Clínica e Implantodontia Oral: Guanabara Koogan; 2010. p. 432-45.

Sacerdote, P, Levrini, L. Peripheral mechanisms of dental pain: the role of substance P. *Mediators Inflamm*. 2012;95:1-6.

Savioli, C, Silva, CAA, Ching, LH, Campos, LMMA, Prado, EFBG, Siqueira, JTT. Dental and facial characteristics of patients with juvenile idiopathic arthritis. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo*. 2004;59(3):93-8.

Savioli, C, Silva, CAA, Fabri, GMC, Kozu, K, Campos, LMA, Bonfá, E, et al., Gingival capillary changes and oral motor weakness in juvenile dermatomyositis. *Rheumatology*. 2010;49(10):1962-70.

Savioli, C, Ribeiro, AC, Fabri, GM, Calich, AL, Carvalho, J, Silva, CA, et al. Persistent periodontal disease hampers anti-tumor necrosis factor treatment response in rheumatoid arthritis. *J Clin Rheumatol*. 2012;18(4):180-4.

Sessle, BJ. Peripheral and central mechanisms of orofacial pain and their clinical correlates. *Minerva Anesthesiol*. 2005;71(4):117-36.

Sessle, BJ. Mechanisms of oral somatosensory and motor functions and their clinical correlates. *J Oral Rehab*. 2006;33:243-261.

Sewards, TV, Sewards, MA. The medial pain system: neural representations of the motivational aspect of pain. *Brain Res Bull*. 2002;59(3):163-80.

Siqueira, JTT, Ching, LH, Nasri, C, Siqueira, SRDT, Teixeira, MJ, Heir, G, et al. Clinical study of patients with persistent orofacial pain. *Arq. Neuro-Psiquiatr*. 2004; 62(4):988-96.

Siqueira, JTT, Teixeira, MJ. *Dores Orofaciais: Diagnóstico e Tratamento*. Artes Médicas; 2012.

Siqueira, SRDT, Rolim, TS, Teixeira, MJ, Nitrini, R, Anghinah, R, Siqueira, JTT. Oral infections and orofacial pain in Alzheimer's disease: Case report and review. *Dement. Neuropsychol*. 2010;4(2):145-150.

Sood, M, Lee, JC, Avivi-Arber, L, Bhatt, P, Sessle, BJ. Neuroplastic changes in the sensorimotor cortex associated with orthodontic tooth movement in rats. *J Comp Neurol*. 2015;523(10):1548-68.

Struillou, X, Boutigny, H, Soueidan, A, Layrolle, P. Experimental Animal Models in Periodontology: A Review. *The Open Dentistry J*. 2010;4:37-47.

Theunissen, M, Peters, ML, Bruce, J, Gramke, HF, Marcus, MA. Preoperative Anxiety and Catastrophizing: A Systematic Review and Meta-analysis of the Association with Chronic Postsurgical Pain. *Clin J Pain*. 2012;28(9):819-41.

Vickers, ER, Boocock, H, Harris, RD, Bradshaw, J, Cooper, M, Vickers, P, et al. Analysis of the acute postoperative pain experience following oral surgery: identification of "unaffected", "disabled" and "depressed, anxious and disabled" patient clusters. *Australian Dental J*. 2006;51(1):69-77.

Watkins, LR, Maier, SF. The pain of being sick: implications of immune-to-brain communication for understanding pain. *Annu Rev Psychol*. 2000;51:29-57.

Weiss, T, Miltner, WHR, Huonker, R, Friedel, R, Schmidt, I, Taub, E. Rapid functional plasticity of the somatosensory cortex after finger amputation. *Exp Brain Res*. 2000;134:199-203.

Williams, R, Paquette, D. *Periodontitis as a Risk for Systemic Diseases*. Tratado de Periodontia Clínica e Implantodontia Oral: Guanabara Koogan; 2010. p. 366-81.

Woolf, CJ. Central sensitization: Implications for the diagnosis and treatment of pain. *Pain*. 2011;152(3 Suppl):S2-15.

Wrona, D. Neural-immune interactions: an integrative view of the bidirectional relationship between the brain and immune systems. *J Neuroimmunol*. 2006;172(1-2):38-58.

Xerri, C. Imprinting of idiosyncratic experience in cortical sensory maps: neural substrates of representational remodeling and correlative perceptual changes. *Behav Brain Res*. 2008;192(1):26-41.

Yirmiya, R, Goshen, I. Immune modulation of learning, memory, neural plasticity and neurogenesis. *Brain Behav Immun*. 2011;25(2):181-213.

Yoshimura, H, Honjo, M, Mashiyama, Y, Kaneyama, K, Segami, N, Sato, J, et al. Multiple tooth-losses during development suppress age-dependent emergence of oscillatory neural activities in the oral somatosensory cortex. *Brain Res*. 2008;1224:37-42.

Zhang, Y, Boudreau, S, Wang, M, Wang, K, Sessle, B, Arendt-Nielsen, L, et al. Effects of periodontal afferent inputs on corticomotor excitability in humans. *J Oral Rehabil*. 2010;37(1):39-47.

APÊNDICES

Apêndice 1: Classificação das doenças periodontais, adaptado de Armitage, 1999

<p>I. Doenças Gingivais</p> <p>A. Doenças gengivais induzidas por placa</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Gingivite associada apenas com placa dental <ol style="list-style-type: none"> a. sem outros fatores locais contribuintes b. com fatores locais contribuintes (ver VIII A) 2. Doenças gengivais modificadas por fatores sistêmicos <ol style="list-style-type: none"> a. associadas com o sistema endócrino <ol style="list-style-type: none"> 1) gengivite associada a puberdade 2) gengivite associada com o ciclo menstrual 3) relacionadas com a gravidez <ol style="list-style-type: none"> a) gengivite b) granuloma piogênico 4) gengivite associada a <i>diabetes mellitus</i> b. associadas a discrasias sanguíneas <ol style="list-style-type: none"> 1) gengivite associada a leucemia 2) outras 3. Doenças gengivais alteradas por medicação <ol style="list-style-type: none"> a. doença gengival induzida por medicamentos <ol style="list-style-type: none"> 1) aumento gengival influenciado por medicação 2) gengivite influenciada por medicamentos <ol style="list-style-type: none"> a) gengivite associada a anticoncepcionais orais b) outros 4. Doença gengival modificada por má-nutrição <ol style="list-style-type: none"> a. gengivite por deficiência de ácido ascórbico b. outras <p>B. Lesões gengivais não induzidas por placa</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Doenças gengivais de origem bacteriana específica <ol style="list-style-type: none"> a. por <i>Neisseria gonorrhoea</i> b. por <i>Treponema pallidum</i> c. por espécies estreptocócicas d. outras 2. Doenças gengivais de origem viral <ol style="list-style-type: none"> a. infecções por herpes vírus <ol style="list-style-type: none"> 1) gengivoestomatite herpética primária 2) herpes oral recorrente 3) infecções por varicela zoster b. outras 	<ol style="list-style-type: none"> 3. Doenças gengivais de origem fúngica <ol style="list-style-type: none"> a. Infecções por cândida <ol style="list-style-type: none"> 1) candidose gengival generalizada b. eritema linear gengival c. histoplasmose d. outras 4. Lesões gengivais de origem genética <ol style="list-style-type: none"> a. fibromatose gengival hereditária b. outras 5. Manifestações gengivais de condições sistêmicas <ol style="list-style-type: none"> a. doenças mucocutâneas <ol style="list-style-type: none"> 1) líquen plano 2) condições penfigóides 3) pênfigo vulgar 4) eritema multiforme 5) lúpus eritematoso 6) induzido por drogas 7) outras b. reações alérgicas <ol style="list-style-type: none"> 1) materiais odontológicos <ol style="list-style-type: none"> a) mercúrio b) níquel c) acrílico d) outros 2) reações atribuídas ao uso de <ol style="list-style-type: none"> a) dentifrícios e pastas de dente b) colutórios/ enxaguantes bucais c) componentes de gomas de mascar d) alimentos e conservantes 3) outros 6. Lesões traumáticas (factícias, iatrogênicas, acidentais) <ol style="list-style-type: none"> a. químicas b. físicas c. térmicas 7. Reações de corpo estranho 8. Não especificadas
---	---

<p>II. Periodontite Crônica</p> <ul style="list-style-type: none"> A. Localizada B. Generalizada <p>III. Periodontite agressiva</p> <ul style="list-style-type: none"> A. Localizada B. Generalizada <p>IV. Periodontite como manifestação de doença sistêmica</p> <ul style="list-style-type: none"> A. Associada com doenças hematológicas <ul style="list-style-type: none"> 1. Neutropenia adquirida 2. Leucemias 3. Outras B. Associado com anormalidades genéticas <ul style="list-style-type: none"> 1. Neutropenia familiar e clínica 2. Síndrome de Down 3. Síndromes de deficiência de adesão leucocitária 4. Síndrome de Papillon-Lefèvre 5. Síndrome de Chediack-Higashi 6. Síndromes histiocitárias 7. Doença de armazenamento de glicogênio 8. Agranulocitose genética infantil 9. Síndrome de Cohen 10. Síndrome de Ehlers-Danlos (Tipos IV e VIII) 11. Hipofosfatase 12. Outros C. Outras não especificadas <p>V. Doença Periodontal Necrotizante</p> <ul style="list-style-type: none"> A. Gengivite ulcerativa necrotizante B. Periodontite ulcerativa necrotizante <p>VI. Abscessos Periodontais</p> <ul style="list-style-type: none"> A. Abscesso gengival B. Abscesso Periodontal C. Abscesso Pericoronal (Pericoronarite) 	<p>VII. Periodontite associada a lesões endodonticas</p> <ul style="list-style-type: none"> A. Lesões endo-pério <p>VIII. Deformidades e Condições adquiridas ou desenvolvidas</p> <ul style="list-style-type: none"> A. Fatores dentais que modificam ou predisõem doenças gengivais e periodontais induzidas por placa <ul style="list-style-type: none"> 1. Fatores de anatomia dental 2. Restaurações 3. Fraturas radiculares 4. Reabsorção radicular cervical B. Deformidades mucogengivais e condições ao redor dos dentes <ul style="list-style-type: none"> 1. Recessão gengival <ul style="list-style-type: none"> a. Faces vestibular e lingual b. Interproximal 2. Falta de gengiva queratinizada 3. Profundidade vestibular diminuída 4. Freios aumentados ou posição muscular 5. Excesso gengival <ul style="list-style-type: none"> a. Pseudo-bolsa b. Margem gengival inconsistente c. Gengiva excessiva d. Aumento gengival (ver IA.3 e I.B.4) 6. Cor anormal C. Deformidades mucogengivais e condições edêntulas <ul style="list-style-type: none"> 1. Deficiência vertical ou horizontal da crista 2. Falta de tecido queratinizado 3. Aumento de tecido gengival 4. Posição de freio/músculos 5. Diminuição da profundidade vestibular 6. Cor anormal D. Trauma Oclusal <ul style="list-style-type: none"> 1. Primário 2. Secundário
---	--

Apêndice 2: Aprovação do Comitê de Ética

APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 29 de Maio de 2013, **APROVOU o(s) documento(s)** abaixo mencionado(s) no Protocolo de Pesquisa nº **380/12**, intitulado: **"AVALIAÇÃO DA DOR, ANSIEDADE E TOPOGRAFIA CORTICAL MOTORA EM RATOS SUBMETIDOS À DOENÇA PERIODONTAL EXPERIMENTAL"** apresentado pelo **Departamento de NEUROLOGIA**.

***Adendo datado de 03.05.2013 referente ao aumento do número de animais**

Pesquisador (a) Responsável: **José Tadeu Tesseroli de Siqueira**

CEP-FMUSP, 07 de Junho de 2013

Prof. Dr. Paulo Eurípedes Marchiori
Vice-Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina
e-mail: cep_fm@usp.br

Apêndice 3: Tabela fornecida pelo fabricante dos filamentos de von Frey com a força de cada filamento. (Touch-Test Sensory Evaluator, North Coast, CA, EUA).

Figure 5—Touch-Test™ Sensory Evaluator Chart

Product Number	Evaluator Size	Target Force*	Representation	Hand & Dorsal Foot Thresholds	Plantar Thresholds
NC12775-01	1.65	0.008	Green	Normal	Normal
NC12775-02	2.36	0.02			
NC12775-03	2.44	0.04			
NC12775-04	2.83	0.07			
NC12775-05	3.22	0.16	Blue	Diminished Light Touch	
NC12775-06	3.61	0.4			
NC12775-07	3.84	0.6	Purple	Diminished Protective Sensation	Diminished Light Touch
NC12775-08	4.08	1			
NC12775-09	4.17	1.4			
NC12775-10	4.31	2			
NC12775-11	4.56	4	Red	Loss of Protective Sensation	Diminished Protective Sensation
NC12775-12	4.74	6			Loss of Protective Sensation
NC12775-13	4.93	8			
NC12775-14	5.07	10			
NC12775-15	5.18	15			
NC12775-16	5.46	26			
NC12775-17	5.88	60			
NC12775-18	6.10	100			
NC12775-19	6.45	180			
NC12775-20	6.65	300		Deep Pressure Sensation Only	Deep Pressure Sensation Only

* Individually calibrated within a 5% standard deviation.