Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto

Programa de Pós-graduação em Reabilitação Oral

*“Análise da expressão de metaloproteinases da matriz em células satélites
gliais do gânglio trigeminal de ratos portadores de inflamação da
articulação temporomandibular persistente submetidos a laserterapia de
baixa intensidade.”*

Equipe: Ac. Amanda de Carvalho Desiderá (doutoranda)

Profa. Dra. Christie Ramos Andrade Leite-Panissi (orientadora)

Profa. Dra. Raquel Fernanda Gerlach (supervisora responsável)

Prof. Dr. Thiago Mattar Cunha (colaborador)

Patrícia Adriana Basile (auxiliar técnica)

Ribeirão Preto

2016

Amanda de Carvalho Desiderá

“Análise da expressão de metaloproteinases da matriz em células satélites gliais do gânglio trigeminal de ratos portadores de inflamação da articulação temporomandibular persistente submetidos a laserterapia de baixa intensidade.”

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre junto ao Programa de Reabilitação Oral.

Área: Reabilitação Oral

Orientadora: Profa. Dra. Christie Ramos Andrade Leite-Panissi

VERSÃO ORIGINAL

Ribeirão Preto

2016

**AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO DO TEOR TOTAL OU PARCIAL
DESTE TRABALHO POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO,
PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central do Campus USP - Ribeirão Preto

Desiderá, Amanda de Carvalho

Análise da expressão de metaloproteinases da matriz em células satélites gliais do gânglio trigeminal de ratos portadores de inflamação da articulação temporomandibular persistente submetidos a laserterapia de baixa intensidade. Ribeirão Preto, 2016.

88 p. : il. ; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Área: Reabilitação Oral.

Orientador: Leite-Panissi, Christie Ramos Andrade

1. Mediadores inflamatórios. 2. Metaloproteinases da matriz. 3. Disfunção Temporomandibular. 4. Laserterapia de baixa intensidade. 5. Células satélites gliais. 6. Gânglio trigeminal.

FOLHA DE APROVAÇÃO**Amanda de Carvalho Desiderá**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor.

Área: Reabilitação Oral**Aprovado em: ____/____/____****Banca Examinadora:****1) Prof.(a). Dr.(a).: _____****Instituição: _____****Julgamento: _____ Assinatura: _____****2) Prof.(a). Dr.(a).: _____****Instituição: _____****Julgamento: _____ Assinatura: _____**

3) Prof.(a). Dr.(a).: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ **Assinatura:** _____

4) Prof.(a). Dr.(a).: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ **Assinatura:** _____

5) Prof.(a). Dr.(a).: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ **Assinatura:** _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho,

À todos que estiveram ao meu lado em todos esses anos de esforço e dedicação.

Principalmente, minha mãe, Maria José, por me dar a oportunidade de realizar meus sonhos, por sempre estar ao meu lado, por ser um exemplo de força nos momentos mais difíceis e por ser tão carinhosa.

A meu marido, Fernando, por estar sempre ao meu lado, ajudando e apoiando em nossa vida juntos, sendo meu companheiro e pai do nosso filho que está por vir.

A minha família: Cesar, meu irmão, tia Neri, tio Márcio, Gabriel e Mateus, meus primos, por me acolher e me apoiar quando mais precisei.

E a Deus por me dar perseverança, humildade e inteligência para continuar trilhando em busca da realização dos meus sonhos.

Sem cada uma dessas pessoas nada disso teria se tornado verdade, ou pelo menos não seria igual.

Obrigada!

Em Memória

Meu pai, Ruthermere José Desiderá, por ter sido um pai tão amoroso. Pela falta que me faz.

AGRADECIMENTOS

À Professora Christie Ramos Andrade Leite Panissi, por permitir participar de seu laboratório como sua orientada, pela oportunidade, pelos ensinamentos.

À Professora Raquel Fernanda Gerlach, por ter cedido seu laboratório para a realização de vários experimentos deste trabalho e por se dispor a ser minha supervisora.

Ao Professor Thiago Mattar Cunha, por permitir a utilização de seu laboratório, apoio técnico e seus equipamentos.

Aos professores da banca, pela disponibilidade e atenção para a leitura desta dissertação.

À Professora Mamie Mizusaki Iyomasa, pelo auxílio e permitir utilizar seu laboratório em alguns momentos.

À Professora Maria José Alves da Rocha, por permitir a utilização dos equipamentos de seu laboratório.

Aos meus amigos do laboratório, Amanda, Carol, Bruna, Daniela, Glauce, Laís, Priscila, João, Richard, Rafael e Vinicius, pelo apoio, ajuda e amizade.

Às técnicas de laboratório Patrícia Adriana Basile e Giuliana Bertozi pelo auxílio técnico durante a experimentação deste estudo.

Aos técnicos do Biotério I da FORP, Aline Ap. Ferrarese Tiballi, Antonio Sérgio Ap. Mesca e Antonio Massaro, pelos cuidados com os animais experimentais.

Aos técnicos do laboratório de histologia Kleber Augusto Loureiro, Gilberto André e Silva e Edna Aparecida Santos e ao pós-graduando Vitor Ap. Castania pelo auxílio nas técnicas de histologia.

Aos secretários, Regiane de C. Tirado Damasceno, Fernanda Thalita de Freitas, Isabel Cristina Galino Sola, Mary Possani Carmessano, pelo auxílio nos aspectos formais que aqui foram despendidos.

À FAPESP, pelo apoio financeiro que permitiu minha dedicação exclusiva e a realização deste trabalho.

Sumário

Lista de Figuras	11
Índice de Tabelas e Equações	14
Lista de Abreviações	15
Resumo	16
Introdução.....	18
Revisão da literatura.....	18
<i>Disfunção temporomandibular</i>	18
<i>Sensibilidade Nociceptiva</i>	20
<i>Metaloproteinases da matriz</i>	23
<i>Papel das citocinas da inflamação e modulação nociceptiva</i>	25
<i>Terapia com Laser de Baixa intensidade para tratamento da DTM</i>	26
<i>Justificativa</i>	27
Objetivos	29
Materiais e Métodos	30
1. <i>Animais</i>	30
2. <i>Indução de Inflamação persistente na ATM</i>	30
3. <i>Tratamento com laser de baixa intensidade (LLLT)</i>	31
4. <i>Coleta do líquido sinovial</i>	32
5. <i>Análise de mieloperoxidase (MPO)</i>	32
6. <i>Análise da expressão de metaloproteinases da matriz no líquido sinovial por meio de zimografia convencional</i>	33
7. <i>Biomarcadores inflamatórios</i>	33
8. <i>Remoção do gânglio trigeminal</i>	34
9. <i>Imunohistoquímica</i>	34
10. <i>Histologia da articulação temporomandibular</i>	35
11. <i>Eutanásia</i>	35
12. <i>Análise dos Resultados</i>	35
13. <i>Grupos Experimentais</i>	36
Resultados	37
1. <i>Análise de mieloperoxidase</i>	37
2. <i>Análise da expressão de metaloproteinases da matriz no líquido sinovial – Zimografia convencional</i>	38
3. <i>Dosagem de Citocinas pró e anti-inflamatórias</i>	43
4. <i>Análise Histológica</i>	52

5. <i>Imunohistoquímica para marcação de MMPs no gânglio trigeminal</i>	58
Discussão.....	72
Conclusão	79
Referências Bibliográficas*.....	80
Anexo I	88

Lista de Figuras

- Figura 1:** Vista lateral da articulação temporomandibular. Fonte: www.geocities.ws 20
- Figura 2:** Organização do Sistema trigeminal. Informações são conduzidas por três ramos do nervo trigêmeo, V par craniano, aos núcleos principal e espinal do trigêmeo. Projeções ipsi e contra-laterais partem desses núcleos com destino ao núcleo ventro-pósteromedial (VPM) e núcleos posteriores (PO) do tálamo, partindo daí para as áreas somatossensoriais primárias (SI) e secundárias (SII) do córtex cerebral. Fonte: Fisiologia - Margarida de Mello Aires, 2ª ed., 1999. 21
- Figura 3:** Classificação e estrutura do domínio das MMPs. Pro, prodomínio; SH, grupo cisteína-tiol; catalytic, domínio catalítico; Zn, zinco na porção catalítica; hinge, região de dobradiça; hemopexina, domínio tipo hemopexina; FN tipo II, inserção de fibronectina tipo II; furin, sítio suscetível a clivagem por furina; TM, domínio transmembrana; C, cauda citoplasmática; GPI, ligante glicosil-fosfatidilinositol. O sinal de sequência localizado no amino terminal em todos não é mostrado no prodomínio. MMP-21 e MMP-23 não estão incluídas nesta lista. Fonte: Ethell IM and Ethell DW (2007) Matrix Metalloproteinases in Brain Development and Remodeling: Synaptic Functions and Targets. *Journal of Neuroscience Research* 85: 2813-2823. 24
- Figura 4:** Esquema de ativação neuronal após reação inflamatória. Injúria periférica induzindo recrutamento de células inflamatórias. Liberação de mediadores como histaminas (hist) e TNF, cuja sensibilização de nociceptores contribui para o recrutamento de neutrófilos e macrófagos. Ambos secretam mediadores TNF e PGE₂. A injúria também inicia a diferenciação de células de Schwann e liberando mediadores algícos como PGE₂, ATP citocinas pró-inflamatórias. Os eventos iniciais promovem o recrutamento de células T os quais secretam uma variedade de citocinas e seus subtipos. Essa sopa de mediadores atua como um mecanismo para aumentar a resposta inflamatória o que contribui para a dor neuropática. Fonte: Moalem G and Tracey DJ (2006) Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain. *Brain Research Reviews* 51: 240 – 264. 26
- Figura 5:** Gráficos de Atividade oxidativa (µg/µl). Resultados obtidos a partir de amostras de animais tratados com LLLT com dose de 10 J/cm², 20 J/cm² e 60 J/cm². Em (*) o grupo CFA foi diferente dos demais grupos dentro do mesmo período, teste de Newman-Keuls. (a) o grupo CFA é diferente dele mesmo quando comparado aos períodos de 1 e 3 dias, teste de Newman-Keuls. Fonte: autoria própria. 38
- Figura 6:** Fotografia de zimogramas representativos de líquido sinovial de ratos submetidos ou não a LLLT 60 J/cm² para os períodos de sobrevivência de 1, 3, 7 e 10 dias. Gráficos de Expressão das gelatinases MMP-2 e MMP-9. A gelatinase MMP-2 foi analisada em seus diferentes pesos moleculares, 64kDa ou forma inativa, 72kDa ou forma ativa, 75kDa ou forma pró-ativa. Em (a) o grupo CFA+LLLTT foi diferente de SAL (P < 0.05, Newman-Keuls). (*) o grupo CFA foi diferente dos grupos SAL e SAL+LASER (P < 0.05, Newman-Keuls). (b) o grupo CFA foi diferente de CFA+LASER. Fonte: autoria própria. 39
- Figura 7:** Fotografia de zimograma representativo para amostras de líquido sinovial de ratos tratados ou não com LLLT com dose de 20 J/cm², para os períodos de sobrevivência de 1, 3, 7 e 10 dias. Gráficos de Expressão das gelatinases MMP-2 e MMP-9. A gelatinase MMP-2 foi analisada em seus diferentes pesos moleculares, 64kDa ou forma inativa, 72kDa ou forma ativa, 75kDa ou forma pró-ativa (a) quando o grupo CFA+LLLTT foi diferente de SAL e SAL+LLLTT (P < 0.05, Newman-Keuls). (*) quando o grupo CFA foi diferente dos demais grupos (P < 0.05, Newman-Keuls). Fonte: autoria própria. 41
- Figura 8:** Fotografia de zimograma representativo para amostras de líquido sinovial de ratos tratados ou não com LLLT com dose de 10 J/cm², para os períodos de sobrevivência de 1, 3, 7 e 10 dias. Gráficos de Expressão das gelatinases MMP-2 e MMP-9. A gelatinase MMP-2 foi analisada em seus diferentes pesos moleculares, 64kDa ou forma inativa, 72kDa ou forma ativa, 75kDa ou forma pró-ativa. Em (a) quando o grupo CFA+LLLTT foi diferente do grupo SAL e SAL+LLLTT. E em (*) quando o grupo CFA foi diferente dos demais grupos. Amostras de líquido sinovial de ratos de diferentes períodos experimentais, 1, 3, 5, 7 e 10 dias após a administração de Adjuvante Completo de Freund (CFA) ou solução salina 0,9 % (SAL), bilateral na região das ATMs, e ainda que foram ou não submetidos a LLLT de baixa intensidade – 10 J/cm². Fonte: autoria própria. 43

- Figura 9:** Gráficos de dosagem da citocina IL-1 α (pg/mL). Gráficos correspondentes às leituras de IL-1 α (pg/mL) para os tratamentos nas doses de laser de 10 J/cm², 20 J/cm² e 60 J/cm². Fonte: autoria própria. 44
- Figura 10:** Gráficos de dosagem da citocina IL-1 β (pg/mL). Gráficos correspondentes às leituras de IL-1 β (pg/mL) para os tratamentos das doses de laser de 10 J/cm², 20 J/cm² e 60 J/cm². (*) o grupo é diferente dos demais grupos no respectivo período. Fonte: autoria própria. 45
- Figura 11:** Gráficos de dosagem da citocina IL-2 (pg/mL). Gráficos correspondentes às leituras de IL-2 para os tratamentos das doses de laser de 10 J/cm², 20J/cm² e 60J/cm². (*) o grupo é diferente dos demais dentro do período (P < 0,05; Newman-Keuls). (a) o respectivo grupo foi diferente dele mesmo quando comparado aos demais períodos (P < 0,05; Newman-Keuls). Fonte: autoria própria. 46
- Figura 12:** Gráficos de dosagem da citocina IL-5 (pg/mL). Gráficos correspondentes às leituras de IL-5 para os tratamentos das doses de laser de 10 J/cm², 20 J/cm² e 60 J/cm². (*) o grupo é diferente dos demais dentro do respectivo período (P < 0,05; Newman-Keuls). (#) o respectivo grupo foi diferente dos grupos CFA e CFA+LASER (P < 0,05; Newman-Keuls). Fonte: autoria própria. 47
- Figura 13:** Gráficos de dosagem da citocina IL-6 (pg/mL). Gráficos correspondentes às leituras de IL-6 para os tratamentos das doses de laser de 10 J/cm², 20J/cm² e 60J/cm². (*) o grupo é diferente dos demais dentro do período (P < 0,05; Newman-Keuls). (a) o respectivo grupo foi diferente dele mesmo quando comparado aos demais períodos (P < 0,05; Newman-Keuls). Fonte: autoria própria. 47
- Figura 14:** Gráficos de dosagem da citocina IL-12p70 (pg/mL). Gráficos correspondentes às leituras de IL-12p70 para os tratamentos das doses de laser de 10 J/cm², 20 J/cm² e 60 J/cm². Em (*) o grupo é diferente dos demais dentro do período (P < 0,05; Newman-Keuls). (a) o respectivo grupo foi diferente dele mesmo quando comparado aos demais períodos (P < 0,05; Newman-Keuls). Fonte: autoria própria. 48
- Figura 15:** Gráficos de dosagem da citocina TNF- α (pg/mL). Gráficos correspondentes às leituras de TNF- α para os tratamentos das doses de laser de 10 J/cm², 20J/cm² e 60J/cm². (*) o grupo é diferente dos demais dentro do período (P < 0,05; Newman-Keuls). (a) o respectivo grupo foi diferente dele mesmo quando comparado aos demais períodos (P < 0,05; Newman-Keuls). (b) o grupo foi diferente do grupo SAL no período de 7 dias (P < 0,05; Newman-Keuls). (#) quando SAL foi diferente de CFA e SAL+LASER (P < 0,05; Newman-Keuls). Fonte: autoria própria. 49
- Figura 16:** Gráfico de dosagem da citocina GM-CSF (pg/mL). Gráficos correspondentes às leituras de GM-CSF para os tratamentos das doses de laser de 10 J/cm², 20 J/cm² e 60 J/cm². (*) o grupo é diferente dos demais dentro do respectivo período (P < 0,05; Newman-Keuls). Fonte: autoria própria. 49
- Figura 17:** Gráficos de dosagem da citocina IFN-g (pg/mL). Gráficos correspondentes às leituras de INF-g para os tratamentos das doses de laser de 10 J/cm², 20 J/cm² e 60 J/cm². (*) o grupo foi diferente dos demais dentro do mesmo período (P < 0,05; Newman-Keuls). (a) o respectivo grupo foi diferente de CFA e CFA+LASER (P < 0,05; Newman-Keuls). Fonte: autoria própria. 50
- Figura 18:** Gráficos de dosagem da citocina IL-4 (pg/mL). Gráficos correspondentes às leituras de IL-4 para os tratamentos das doses de laser de 10 J/cm², 20 J/cm² e 60 J/cm². (*) o grupo foi diferente dos demais dentro do respectivo período (P < 0,05; Newman-Keuls). (a) o respectivo grupo foi diferente dele mesmo quando comparado aos demais períodos de experimentação (P < 0,05; Newman-Keuls). (b) o grupo foi diferente de CFA e CFA+LASER (P < 0,05; Newman-Keuls). Fonte: autoria própria. 51
- Figura 19:** Gráficos de dosagem da citocina IL-10 (pg/mL). Gráficos correspondentes às leituras de IL-10 para os tratamentos das doses de laser de 10 J/cm², 20 J/cm² e 60 J/cm². Fonte: autoria própria. 51
- Figura 20:** Gráficos de dosagem da citocina IL-13 (pg/mL). Gráficos correspondentes às leituras de IL-13 para os tratamentos das doses de laser de 10 J/cm², 20J/cm² e 60J/cm². (*) o grupo é diferente dos demais dentro do período (P < 0,05; Newman-Keuls). (b) o respectivo grupo foi diferente do grupo CFA e CFA+LASER dentro do mesmo período (P < 0,05; Newman-Keuls). Fonte: autoria própria. 52
- Figura 21:** Aspectos anatômico de peças de ATM removidas de animais que receberam SAL (à esquerda) ou CFA (à direita). Fotografia retirada de amostras de ratos com máquina fotográfica Cannon com zoom automático. Fonte: autoria própria. 52
- Figura 22:** Fotomicrografia de ATM com aumento de 5x. Em destaque, o aspecto anatômico de ATM de rato em corte sagital com visualização da região anterior, média e posterior do disco e cápsula articular. Fonte: autoria própria. 53

- Figura 23:** Gráfico de células inflamatórias. Análise de lâminas histológicas coradas em H&E e analisadas para quantificação de células polimorfonucleares em côndilos mandibulares de ratos tratados com CFA ou SAL e submetidos ou não a LLLT com dose de $60\text{J}/\text{cm}^2$. (a) quando o grupo CFA+LLLT foi diferente dos demais grupos ($P < 0,05$; Newman-Keuls). (*) quando o grupo é diferente de SAL e SAL+LASER ($P < 0,05$; Newman-Keuls). Fonte: autoria própria. 54
- Figura 24:** Fotomicrografias representativas de articulação temporomandibular com coloração de HE com aumento de 40x. Região de cabeça do côndilo, especificamente, cápsula articular, evidenciando a presença de infiltrado inflamatório. Representação de grupos tratados com ou sem laser de baixa intensidade na dose de $60\text{J}/\text{cm}^2$. 55
- Figura 25:** Gráfico de células inflamatórias. Análise de lâminas histológicas coradas em H&E e analisadas para quantificação de células polimorfonucleares em côndilos mandibulares de ratos tratados com CFA ou SAL e submetidos ou não a LLLT com dose de $20\text{J}/\text{cm}^2$. (a) quando o grupo CFA foi diferente de SAL e SAL+LLLT ($P < 0,05$; Newman-Keuls). (*) quando o grupo CFA é diferente dos demais grupos ($P < 0,05$; Newman-Keuls). Fonte: autoria própria. 56
- Figura 26:** Fotomicrografias representativas de articulação temporomandibular com coloração de HE com aumento de 40x. Região de cabeça do côndilo, especificamente, cápsula articular, evidenciando a presença de infiltrado inflamatório (setas). Representação de grupos tratados com ou sem laser de baixa intensidade na dose de $20\text{J}/\text{cm}^2$. Fonte: autoria própria. 56
- Figura 27:** Gráfico de células inflamatórias. Análise de lâminas histológicas coradas em H&E e analisadas para quantificação de células polimorfonucleares em côndilos mandibulares de ratos tratados com CFA ou SAL e submetidos ou não a LLLT de baixa intensidade com dose de $10\text{J}/\text{cm}^2$. (a) quando o grupo CFA foi diferente de SAL e SAL+LLLT ($P < 0,05$; Newman-Keuls). (*) quando o grupo CFA é diferente dos demais grupos ($P < 0,05$; Newman-Keuls). Fonte: autoria própria. 57
- Figura 28:** Fotomicrografias representativas de articulação temporomandibular com coloração de HE com aumento de 40x. Região de cabeça do côndilo, especificamente, cápsula articular, evidenciando a presença de infiltrado inflamatório (setas). Representação de grupos tratados com laser de baixa intensidade na dose de $10\text{J}/\text{cm}^2$. Fonte: autoria própria. 58
- Figura 29:** Gráfico de expressão de MMP-2. Gráfico evidenciando análise comparativa entre os grupos SAL, CFA, SAL+LASER e CFA+LASER após aplicação de LLLT $10\text{J}/\text{cm}^2$. (#) quando o grupo foi diferente dos tratamentos SAL+LASER e CFA+LASER ($P < 0,05$; Newman-Keuls). Fonte: autoria própria. 60
- Figura 30:** Fotomicrografias representativas do grupo $10\text{J}/\text{cm}^2$ marcados para MMP-2. Na imagem são apresentadas fotos de lâminas imunofluorescentes marcadas para MMP-2 e GFAP ou Iba-1. Na última linha de imagens, estão apresentadas imagens representativas de cortes corados em H&E mostrando a região do gânglio trigeminal contendo corpos celulares. Imagens com aumento de 40x. Fonte: autoria própria. 61
- Figura 31:** Gráfico de expressão de MMP-9. Gráfico evidenciando análise comparativa entre os grupos SAL, CFA, SAL+LASER e CFA+LASER após aplicação de LLLT $10\text{J}/\text{cm}^2$. (#) quando o grupo foi diferente dos tratamentos SAL+LASER e CFA+LASER ($P < 0,05$; Newman-Keuls). Fonte: autoria própria. 62
- Figura 32:** Fotomicrografias representativas do grupo $10\text{J}/\text{cm}^2$ marcados para MMP-9. Na imagem são apresentadas fotos de lâminas imunofluorescentes marcadas para MMP-2 e GFAP ou Iba-1. Na última linha de imagens, estão apresentadas imagens representativas de cortes corados em H&E mostrando a região do gânglio trigeminal contendo corpos celulares. Imagens com aumento de 40x. Fonte: autoria própria. 63
- Figura 33:** Gráfico de expressão de MMP-2. Gráfico evidenciando análise comparativa entre os grupos SAL, CFA, SAL+LASER e CFA+LASER após aplicação de LLLT $20\text{J}/\text{cm}^2$. (*) o grupo foi diferente dos demais dentro do mesmo período ($P < 0,05$; Newman-Keuls). (a) o grupo no período de 7 dias foi diferente do mesmo grupo quando comparado aos demais períodos ($P < 0,05$; Newman-Keuls). Fonte: autoria própria. 64
- Figura 34:** Fotomicrografias representativas do grupo $20\text{J}/\text{cm}^2$ marcados para MMP-2. Na imagem são apresentadas fotos de lâminas imunofluorescentes marcadas para MMP-2 e GFAP ou Iba-1. Na última linha de imagens, estão apresentadas imagens representativas de cortes corados em H&E mostrando a região do gânglio trigeminal contendo corpos celulares. Imagens com aumento de 40x. Fonte: autoria própria. 65
- Figura 35:** Gráfico de expressão de MMP-9. Gráfico evidenciando análise comparativa entre os grupos SAL, CFA, SAL+LASER e CFA+LASER após aplicação de LLLT $20\text{J}/\text{cm}^2$. (*) o grupo foi diferente dos demais dentro do mesmo período ($P < 0,05$; Newman-Keuls). Em (#) o respectivo grupo foi diferente dos grupos

SAL+LASER e CFA+LASER ($P < 0,05$; Newman-Keuls). Em (b) o grupo no período de 7 dias foi diferente dos grupos SAL e CFA+LASER ($P < 0,05$; Newman-Keuls). Fonte: autoria própria. 66

Figura 36: Fotomicrografias representativas do grupo 20 J/cm² marcados para MMP-9. Na imagem são apresentadas fotos de lâminas imunofluorescentes marcadas para MMP-2 e GFAP ou Iba-1. Na última linha de imagens, estão apresentadas imagens representativas de cortes corados em H&E mostrando a região do gânglio trigeminal contendo corpos celulares. Imagens com aumento de 40x. Fonte: autoria própria 67

Figura 37: Gráfico de expressão de MMP-2. Gráfico evidenciando análise comparativa entre os grupos SAL, CFA, SAL+LASER e CFA+LASER após aplicação de LLLT 60J/cm². (*) o grupo foi diferente dos demais dentro do mesmo período ($P < 0,05$; Newman-Keuls). (#) o respectivo grupo foi diferente dos grupos SAL+LASER e CFA+LASER ($P < 0,05$; Newman-Keuls). (a) o respectivo grupo no período de 7 dias foi diferente dos grupos SAL+LASER e CFA+LASER ($P < 0,05$; Newman-Keuls). Fonte: autoria própria. 68

Figura 38: Fotomicrografias representativas do grupo 60 J/cm² marcados para MMP-2. Na imagem são apresentadas fotos de lâminas imunofluorescentes marcadas para MMP-2 e GFAP ou Iba-1. Na última linha de imagens, estão apresentadas imagens representativas de cortes corados em H&E mostrando a região do gânglio trigeminal contendo corpos celulares. Imagens com aumento de 40x. Fonte: autoria própria 69

Figura 39: Gráfico de expressão de MMP-2. Gráfico evidenciando análise comparativa entre os grupos SAL, CFA, SAL+LASER e CFA+LASER após aplicação de LLLT 60 J/cm². Fonte: autoria própria. 70

Figura 40: Fotomicrografias representativas do grupo 60 J/cm² marcados para MMP-9. Na imagem são apresentadas fotos de lâminas imunofluorescentes marcadas para MMP-9 e GFAP ou Iba-1. Na última linha de imagens, estão apresentadas imagens representativas de cortes corados em H&E mostrando a região do gânglio trigeminal contendo corpos celulares. Imagens com aumento de 40x. Fonte: autoria própria. 71

Índice de Tabelas e Equações

Tabela 1: Especificações para aplicação de laser de baixa intensidade.....31

Equação 1: Fórmula para cálculo da densidade de energia (J) a partir da energia (W) e tempo (s) aplicados.....32

Lista de Abreviações

Articulação Temporomandibular	ATM
Disfunção/ Disordem Temporomandibular	DTM
Células Satélites Gliais	CSG
Mensageiro de receptor 1 para glutamato	mGluR1
Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina	CGRP
Adjuvante Completo de Freund	CFA
Solução salina 0.9%	SAL
Gânglio trigeminal	TG
Laserterapia de Baixa Intensidade	LLLT
Joules	J
Watts	W
Segundos	s
Metaloproteinase da matriz	MMP
Mieloperoxidase	MPO
Tampão brometo de hexadeciltrimetilamônio	HTAB
Água oxigenada	H ₂ O ₂
Coloração de Hematoxilina e Eosina	H&E
Espécies Reativas de Oxigênio	ROS
Micrometros	µm
Microlítros	µL
Paraformaldeído 4%	PFA 4%
Soro de Albumina Bovina Metilada	mBSA
Fator de Necrose Tumoral	TNF
Interleucina	IL
Ácido Ribonucleico	RNA
Prostaglandina E2	PGE ₂

Resumo

A dor é uma das principais sintomatologias capazes de levar indivíduos a buscar tratamento médico-odontológico. Na odontologia estima-se que cerca de 40 a 75% da população seja portadora de dor de origem orofacial e tenha pelo menos um sinal ou sintoma de disfunção temporomandibular (DTM). A DTM corresponde a um quadro patológico de caráter multifatorial que acomete a articulação temporomandibular (ATM) e os músculos mastigatórios, ocasionando dores na região orofacial bem como alterações na realização de movimentos bucais. O principal sinal desta enfermidade é a inflamação articular, a qual gera dor nas estruturas relacionadas. A inflamação, por sua vez, leva a liberação de mediadores tais como, substância P, peptídeo relacionada ao gene da calcitonina (CGRP), além de fator de necrose tumoral α (TNF- α) e interleucina 1β (IL- 1β). Estes mediadores sensibilizam as terminações nervosas livres e a informação nociceptiva caminha para a primeira estação sináptica, o gânglio trigeminal. A inflamação quando persistente promove a expressão de metaloproteinases da matriz (MMP), cuja ação modifica a matriz extracelular podendo, então, modular vias neuronais de percepção. Células satélites gliais (CSGs) são células envolvidas no suporte microambiente neuronal e, possivelmente, células que atuam na modulação de vias de percepção nociceptiva. Conhecendo mais profundamente os mecanismos de modulação da dor, são buscadas terapêuticas não invasivas eficientes para atenuar a sintomatologia dolorosa advinda da DTM. A laserterapia de baixa intensidade (LLLT) mostra-se como um tratamento eficiente, porém seu efeito dose-dependente gera resultados ambíguos. Nesse contexto o presente trabalho teve como objetivos verificar os biomarcadores inflamatórios presentes no fluído sinovial em ratos portadores de inflamação persistente da ATM, tratados ou não com LLLT.

Foram utilizados ratos Wistar (200-240g, n=440 - CEUA 2013.1.1111.58.7), os quais receberam administração de CFA (Adjuvante Completo de Freund) ou salina 0,9% (SAL) intraarticular e que foram submetidos (LLLT) ou não a aplicação de laser na região temporomandibular no primeiro dia, 1 hora após a indução da inflamação, e nos dias 3, 5, 7 e 10 após indução da inflamação. Resultados obtidos neste trabalho mostram que a LLLT reduz as células polimorfonucleares presentes na cápsula articular das ATM, e, também, de espécies reativas de oxigênio (redução da atividade de mieloperoxidase - MPO). Ainda, verificou-se a redução da expressão de MMP-2 e MMP-9 no líquido sinovial de ratos com inflamação persistente induzida pela administração de CFA intraarticular. Citocinas pró-inflamatórias (por exemplo: IL- 1α , IL- 1β , IL-6, IL-12p70, IFN- γ , GM-CSF e TNF- α .) analisadas do líquido sinovial mostraram aumento significativo em sua expressão quando da presença de inflamação, a LLLT reduziu a expressão de

dessas citocinas. No entanto, a fotoestimulação em alguns momentos na ausência de inflamação estimulou a expressão das citocinas IL-2, IL-5, IL-12p70, GM-CSF. Além disso, a terapia fotodinâmica aumentou expressão das citocinas anti-inflamatórias IL-4, IL-10 e IL-13 na presença de inflamação. A análise da imunofluorescência para marcação de MMP-2 e MMP-9 co-localizadas para células suporte mostrou que a expressão mais significativa ocorreu em neurônios, e resultados apontam que a LLLT na dose de $60\text{J}/\text{cm}^2$ não reduziu a expressão dessas gelatinases no gânglio trigeminal.

Introdução

Existem algumas patologias de difícil diagnóstico e da mesma forma seu tratamento mostra-se tão complexo quanto sua origem, como é o caso a Disfunção Temporomandibular (DTM). A DTM é uma patologia que acomete a articulação temporomandibular (ATM) e possui diagnóstico difícil e tratamento complexo e multidisciplinar.

Com relação aos sintomas este processo caracteriza-se por ser, em geral, de caráter crônico passando por períodos de agudização. Com relação a esse processo, a inflamação é o principal responsável pela sintomatologia dolorosa e caracteriza-se pela liberação de mediadores inflamatórios locais que fazem a comunicação célula-a-célula e fazem com que terminações nervosas sejam sensibilizadas. Esta sensibilidade dolorosa caminha pelas fibras de neurônios de primeira ordem, com corpos localizados no gânglio trigeminal, e segue até estruturas superiores para ser interpretada.

Os mediadores inflamatórios correspondem a uma classe diversificada de citocinas (IL-1 β , TNF, INF, GM-CSF), proteases (TIMPs e MMPs) e produtos da degradação celular e da matriz extracelular (MEC) e que são responsáveis pela sensibilização das terminações nervosas. Em acréscimo, as alterações causadas pela inflamação ao longo do sistema nervoso têm sido relacionadas ao processo de alterações psicológicas comuns em pacientes com quadro de DTM (YOUNGER e cols., 2010; PARENT e cols., 2012).

No que se refere ao tratamento ao tratamento de pacientes portadores de DTM, é comum o emprego de diferentes métodos, dentre eles, destaca-se o uso de terapias alternativas ao uso de medicação. A terapia com laser de baixa intensidade (LLLT) mostra resultados benéficos para o tratamento de DTM, como a redução da inflamação e regeneração tecidual, mas não se sabe se este tratamento seria capaz de modular a percepção dolorosa e minimizar a sintomatologia.

Nesse contexto, buscamos neste trabalho avaliar o efeito da LLLT sobre a inflamação em modelo de inflamação experimental da ATM em ratos e a modulação de biomarcadores inflamatórios (citocinas e MMPs) no líquido sinovial e MMPs no gânglio trigeminal.

Revisão da literatura

Disfunção temporomandibular

A sensibilidade dolorosa é um dos principais sintomas que levam indivíduos a buscarem tratamento médico-odontológico. Na odontologia, estima-se que cerca de 40% - 75% da população

apresenta algum tipo de dor orofacial e pelo menos um dos sintomas associados a Disfunção Temporomandibular (DTM) (ANDRADE e cols., 2012).

A DTM possui aspecto multifatorial, sendo o componente inflamatório um fator preponderante na sintomatologia dolorosa. De fato, a inflamação periférica é a maior causa de dores crônicas e persistentes como descrito por WATKINS e MAIER (2002). A dor crônica relacionada à DTM é não é claramente localizada na ATM e músculos mastigatórios e pode irradiar-se ou ser referida para regiões adjacentes: oral, cranial, facial e cervical. Frequentemente, a DTM é acompanhada por dores de cabeça, limitação da articulação mandibular (CAIRNS, 2010), ruídos articulares e fadiga da articulação (EGERMARK e cols., 2005). A causa desta enfermidade é compreendida como sendo de caráter multifatorial, envolvendo fatores estruturais, fisiológicos, comportamentais e ambientais. Ainda é possível observar correlação considerando a prevalência de DTM em mulheres, possivelmente, devido ao hormônio sexual feminino, estrógeno – sendo duas vezes maior a prevalência da DTM em mulheres do que em homens (CAIRNS, 2010, WADHWA & KAPILA, 2008). Em acréscimo, a DTM pode ser classificada de acordo com a estrutura comprometida da articulação. Assim a DTM pode ser devido à inflamação da membrana sinovial (sinovite) e/ou na cápsula articular (capsulite), resultando de trauma local, infecção ou degeneração, ou ser parte de uma alteração na formação de colágeno ou poliartrite sistêmica, como por exemplo, a artrite reumatóide (LUND e cols., 2002).

A articulação temporomandibular (ATM) é a articulação envolvida nesta enfermidade. Ela é formada pelo côndilo mandibular associado à fossa do osso temporal, separando estes dois ossos do contato direto há o disco articular (Figura 1). Sua porção articular mais anterior é composta por tecido conectivo fibroso e destituído de vasos e inervação, contrariamente a porção posterior, inervada e vascularizada, ele também divide a cavidade articular em compartimento superior e inferior. A cartilagem que recobre o côndilo mandibular é dividida em quatro partes: a superficial, a proliferativa, a condroblástica e a hipertrófica. Ainda, a ATM é uma articulação que se diferencia das demais quando analisadas sua composição e desenvolvimento. Trata-se de uma articulação formada por fibrocartilagem e possui colágeno tipo I e II, sendo capaz de absorver melhor as tensões do que a cartilagem de hialina (WADHWA & KAPILA, 2008).

Figura 1: Vista lateral da articulação temporomandibular. **Fonte:** www.geocities.ws

Em geral, as patologias que acometem a ATM resultam de um desequilíbrio metabólico e funcional que causam a liberação de fatores inflamatórios. Os primeiros sinais e sintomas podem ser subclínicos, e normalmente tem um diagnóstico tardio (WADHWA & KAPILA, 2008). Estudos mostraram que durante o desenvolvimento da DTM a reação inflamatória advinda da liberação de citocinas, como TNF- α e a IL-1 β (PINTO e cols., 2010), sensibiliza as células da cartilagem articular que passam a expressar neuropeptídeos (CGRP e substância P) responsáveis por sensibilizar o sistema nervoso periférico, em particular as terminações nervosas livres. As terminações nervosas livres são consideradas a primeira estação para o sistema nervoso central, e estão presentes, principalmente, em fibras do tipo C ou A δ (CATERINA & JULIUS, 1999). Estas estruturas fazem parte de neurônios classificados como pseudounipolares, uma vez que possuem seus corpos localizados no gânglio trigeminal ou nos gânglios da raiz dorsal da medula espinhal, emitindo um de seus ramos a periferia e outro para o tronco encefálico ou medula espinhal, onde realizam sinapse com neurônios de segunda ordem. Os neurônios de segunda ordem realizam sinapses em estruturas do sistema límbico, e em outras áreas encefálicas, com destaque o córtex somatossensorial primário, responsável pela avaliação da qualidade e intensidade do estímulo.

Sensibilidade Nociceptiva

A partir da década de 90, estudos por imagem permitiram visualizar as vias nociceptivas mostrando que a dor não é apenas processada por regiões corticais, mas também por várias regiões cerebrais distribuídas (BROOKS & TRACEY, 2005). Foi, então, possível identificar que os axônios de neurônios de segunda ordem levam a informação nociceptiva via trato espinotrigemino talâmico a neurônios talâmicos de terceira ordem, os quais se projetam para o córtex somatossensorial primário

e para áreas adjacentes, tais como o sistema límbico, conferindo à dor suas propriedades cognitivas e emocionais (PURVES e cols., 2001; AGUGGIA, 2003).

Figura 2: Organização do Sistema trigeminal. Informações são conduzidas por três ramos do nervo trigêmeo, V par craniano, aos núcleos principal e espinal do trigêmeo. Projeções ipsi e contra-laterais partem desses núcleos com destino ao núcleo ventro-pósteromedial(VPM) e núcleos posteriores(PO) do tálamo, partindo daí para as áreas somatossensoriais primárias (SI) e secundárias (SII) do córtex cerebral. **Fonte:** Fisiologia - Margarida de Mello Aires, 2ª ed., 1999.

No estudo da sensibilidade dolorosa, trabalhos mostraram haver modulação da percepção da dor devido a modificações nos neurônios sensoriais induzidas pela inflamação. Sabe-se que durante a sensibilização dos neurônios periféricos há a liberação de diversos neurotransmissores excitatórios tais como, o glutamato, os neuropeptídeos, a substância P e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) (DUBNER & REN, 2004). Estes neurotransmissores excitatórios garantem a hiperexcitabilidade de neurônios de núcleos sensoriais, através da despolarização neuronal, fosforilação dos receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA) e alterações na cinética neuronal (DUBNER & REN, 2004). Foi mostrado que antagonistas de receptores NMDA podem atuar nos

sítios de reconhecimento ou no bloqueio dos canais iônicos podendo reverter quase completamente a hiperalgesia térmica e mecânica (REN & DUBNER, 1993). No mais, sabe-se que os receptores de glutamato (mGluRs) estão envolvidos com respostas nociceptiva e seu envolvimento é acentuado quando o estímulo nocivo se prolonga (REN & DUBNER, 1999). Foi visto que animais tratados com um reagente antisense de oligonucleotídeo mGluR1, administrado continuamente no espaço lombar da medula espinal, desenvolveu marcada analgesia mensurada pelo aumento na latência do teste de retirada de cauda (YOUNG e cols., 1998). Além do mais, a inflamação das ATMs advinda da administração de Adjuvante Completo de Freund (CFA) levou ao aumento de campos receptivos no subnúcleo caudal do trigêmeo (IWATA e cols., 1999), evidenciando o aumento da atividade destes neurônios durante o processo inflamatório.

Para o entendimento da modulação da dor, tem sido estudada a participação das células satélites gliais (CSGs). Estas células ocupam posição única, localizando-se ao redor de neurônios sensoriais, tem sido descrita sua participação em estados patológicos associados à inflamação e dor (DUBLIN & HANANI, 2006). As células satélites gliais (CSGs) podem ser encontradas no sistema nervoso central assim como em gânglios sensoriais, como gânglio trigeminal e gânglio da raiz dorsal (HANANI, 2005). Estas células fornecem suporte metabólico de neurônios e podem diferenciar-se em astrócitos, células de Schwann e oligodendrócitos (HANANI, 2005). Observou-se a remodelação das junções entre as CSGs após a indução de inflamação na pata traseira de ratos com CFA, revelando o aumento do acoplamento entre as CSGs (DUBLIN & HANANI, 2006). Também foi observado o aumento das junções gap na medula espinal associado à hiperalgesia (SPATARO e cols., 2004). Este aumento das junções gap são uma característica funcional dos astrócitos, e esse acoplamento pode facilitar a comunicação entre neurônios permitindo a passagem de corrente elétrica e de outras moléculas sinalizadoras (HANANI, 2005). É evidenciado também que o estímulo da bradicinina – um potente sensibilizador durante a resposta inflamatória – em cultura de CSGs produza uma corrente interna similar a ocorrida em tecido nervoso (HEBLICH e cols., 2001). No mais, foi mostrado que as células gliais da substância cinzenta periaquedutal tiveram sua atividade aumentada após a administração de morfina levando a tolerância e a modulação da atividade das mesmas quando da inflamação persistente induzida pela administração de CFA na pata traseira de ratos (EIDSON & MURPHY, 2013).

Adicionalmente, foram encontradas nas CSGs receptores para prostaglandinas (PG), os quais quando ativados durante a resposta inflamatória aumentaram a síntese de TNF- α e PG pelas CSGs, promovendo hipersensibilidade dos neurônios adjacentes (OHTORI e cols., 2004).

Em contrapartida, além das evidências apontadas sobre a atuação das CSGs para a modulação da dor, uma vertente mostra que as metaloproteinases da matriz (MMPs) também participam de

processos inflamatórios e da modulação a informação nociceptiva, devido sua participação na modulação na inflamação e do microambiente neuronal.

Metaloproteinases da matriz

As metaloproteinases da matriz são uma família de 24 endopeptidases com capacidade para clivar vários componentes da MEC, tais como colágeno, elastina, gelatinas, caseína, e outros (BÄCK e cols., 2010). Originalmente, as enzimas que clivam moléculas da matriz extracelular foram nomeadas de acordo com o substrato degradado, por exemplo, as collagenases são enzimas que degradam colágeno (CAUWE & OPDENAKKER, 2010).

Apesar de algumas MMPs serem constitutivamente expressas, outras são altamente dependentes de regulação transcricional envolvendo ação proteolítica para a sua expressão. A maioria das MMPs está expressa na proforma latente e requerem ativação pela atividade proteolítica. A atividade das MMPs é regulada principalmente por meio de inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs), os quais são responsáveis pelo equilíbrio endógeno, evitando-se a degradação excessiva de MEC. O desequilíbrio entre a ação das MMPs e a regulação feita pelos TIMPs poderia causar a desregulação da atividade das MMPs e levar, por exemplo, a condição patológica com alterações na estrutura de parede no vaso associada com aterotrombose (BÄCK e cols., 2010).

Figura 3: Classificação e estrutura do domínio das MMPs. Pro, prodomínio; SH, grupo cisteína-tiol; catalytic, domínio catalítico; Zn, zinco na porção catalítica; hinge, região de dobradiça; hemopexina, domínio tipo hemopexina; FN tipo II, inserção de fibronectina tipo II; furin, sítio suscetível a clivagem por furina; TM, domínio transmembrana; C, cauda citoplasmática; GPI, ligante glicosil-fosfatidilinositol. O sinal de sequência localizado no amino terminal em todos não é mostrado no prodomínio. MMP-21 e MMP-23 não estão incluídas nesta lista. **Fonte:** Ethell IM and Ethell DW (2007) Matrix Metalloproteinases in Brain Development and Remodeling: Synaptic Functions and Targets. Journal of Neuroscience Research 85: 2813-2823.

Diversos estudos evidenciaram o envolvimento das MMPs em diferentes processos fisiológicos, como reprodução, desenvolvimento, reações imunológicas, bem como em processos patológicos, tais como, câncer, inflamação, doença autoimune, doença vascular e desordens neurodegenerativas (PARKS e cols., 2004, EGEGLAD & WERB, 2002). É evidenciado a participação das MMPs em processos inflamatórios do sistema nervoso central, tem sido mostrado que após a injeção intracerebral de lipopolissacarídeo (LPS) ocorreu o aumento de MMP-3 e MMP-9 seguido de ruptura da barreira hemato-encefálica (CANDELARIO-JALIL e cols, 2009).

Com relação a expressão de metaloproteinases da matriz no sistema nervoso central, CHENG-YOU & SHIH-CHAN (2013) mostraram que a infecção pelo parasita *Toxoplasma gondii* no sistema nervoso, especificamente da astróglia, aumentou a expressão de MMP-2 e MMP-9 no tecido poucas horas após a infecção. Ainda, é descrita a participação das MMPs na formação de sinapses, na plasticidade sináptica e em potenciais de longa duração, além disso, também foi mostrado que ratos knockout para MMP-9 mostraram deficiência no comportamento de aprendizagem associativa dependente do hipocampo (ETHELL & ETHELL, 2007). Em conjunto, estes achados, evidenciam a atuação das MMPs em processos fisiológicos e mesmo patológicos do sistema nervoso central, sugerindo sua participação durante as modificações neuronais.

Considerando processos inflamatórios de tecidos profundos, como ocorre na DTM, ISHIMARU e cols. (2000), mostraram que a concentração de MMP-3 no fluído sinovial de pacientes com sintomatologia dolorosa era maior do que em pacientes sem sinais de DTM. Ainda TANAKA (2001) evidenciou a presença das gelatinases MMP-2 e MMP-9 em amostras do fluído sinovial de pacientes portadores de DTM. Em acréscimo, trabalho de KAWASAKI e cols. (2008) mostraram a expressão dessas mesmas gelatinases, MMP-2 e MMP-9, no gânglio da raiz dorsal de ratos após ligadura de nervo ciático. Ainda, durante o período de 21 dias, as MMP-2 e MMP-9 foram analisadas e verificou-se a expressão mais acentuada de MMP-9 durante a fase de desenvolvimento da inflamação e em contrapartida, a MMP-2 foi mais expressa na fase tardia de inflamação persistente (KAWASAKI e cols., 2008). JI e cols. (2009) verificaram que MMP-2 e MMP-9 estão envolvidas no

desenvolvimento primário e tardio da dor neuropática e o mecanismo não neuronal envolvido se dá através de células do sistema imune e glial (microglia e astrócitos).

Através do conhecimento obtido por meio do estudo das metaloproteinases da matriz e do seu envolvimento com a resposta inflamatória, bem como a modulação da dor, novos tratamentos para dores de origem orofacial têm sido estudados fundamentados na participação das MMPs.

Papel das citocinas da inflamação e modulação nociceptiva

A resposta inata que ocorre nos casos de DTM é similar àquela que ocorre na artrite reumatoide (AR), pois esta assim como na DTM acomete as articulações sinoviais. Primariamente é caracterizada pela expressão desregulada de moléculas associadas ao dano ou ao patógeno de células de diferentes linhagens (McINNES, 2015). São destacadas diferentes citocinas que participam do desenvolvimento da resposta inflamatória na DTM como IL-1 β , INF- γ , TNF- α , IL-10, IL-12 (VERNAL e cols., 2008). IL-1 é uma família de várias citocinas dentre elas IL-1 α , IL-1 β , IL-1Ra, IL-18, IL-33 and IL-36, e o tratamento com base nessa citocina já é utilizado com sucesso na clínica (McINNES, 2015). Também destaca-se a fundamental importância das citocinas IL-6 e TNF- α no desenvolvimento da patologia e como alvos de terapêutica. E, mais recentemente, IL-17 e fator estimulador de colônia de granulócito e macrófago (GM-CSF) têm sido apontados como alvo no tratamento específico da doença (McINNES, 2015).

Ainda, sabe-se que o TNF- α e IL-1 β induzem modificações em terminações nervosas livres e produzem hiperalgesia (CUNHA e cols., 2008). Em destaque, evidências mostraram que a IL-17 é capaz de produzir hipernocicepção (PINTO e cols. 2010) e estimular a expressão de IL-1 β e TNF- α , além de inibir a expressão de citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-13 (JOVANOVIĆ e cols., 1998). No entanto, JOVANOVIĆ e cols. (1998) mostraram que IL-10, uma citocina anti-inflamatória, pode bloquear o efeito da IL-17 e com isso, reduzir a expressão de outras citocinas pró-inflamatórias.

No sistema nervoso central, o estudo de OHTORI e cols. (2004) com modelo de secção de nervo ciático mostraram imunorreatividade para proteína ácida fibrilar glial (GFAP) e receptores para TNF- α em CSGs da medula espinhal. WATKINS & MAIER (2002) destacaram que dentre os pontos que modulam a dor crônica as citocinas pró-inflamatórias (TNF, IL-1 e IL-6) exercem papel fundamental na hiperexcitabilidade neuronal periférica, resultando em alodinia e hipersensibilidade. Ainda, a administração do adjuvante completo de Freund (CFA) na pata traseira de ratos produziu inflamação e após 7 dias verificou-se ativação microglial no corno dorsal da medula espinhal e no núcleo grácil, bem como aumento da sensibilidade nociceptiva (LIN e cols., 2007).

Figura 4: Esquema de ativação neuronal após reação inflamatória. Injúria periférica induzindo recrutamento de células inflamatórias. Liberação de mediadores como histaminas (hist) e TNF, cuja sensibilização de nociceptores contribui para o recrutamento de neutrófilos e macrófagos. Ambos secretam mediadores TNF e PGE₂. A injúria também inicia a diferenciação de células de Schwann e liberando mediadores algícos como PGE₂, ATP citocinas pró-inflamatórias. Os eventos iniciais promovem o recrutamento de células T os quais secretam uma variedade de citocinas e seus subtipos. Essa sopa de mediadores atua como um mecanismo para aumentar a resposta inflamatória o que contribui para a dor neuropática. **Fonte:** Moalem G and Tracey DJ (2006) Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain. Brain Research Reviews 51: 240 – 264.

É destacado que tanto as citocinas como as MMPs estão envolvidas no desenvolvimento e manutenção da inflamação (McINNES, 2015; MANICONE & McGUIRE, 2008). Ainda, estudos da última década sugerem a participação destes moduladores nas vias de percepção da dor (JI e cols., 2009; LIN e cols., 2007). Além do mais, essas vias sensoriais podem ser susceptíveis ao tratamento farmacológico com uso de analgésicos opióides, e, ao tratamento com terapias alternativas (BYRNES e cols., 2006; BERTA e cols., 2012). Estudo com modelo de administração subcutânea de morfina, mostrou aumento da expressão de GFAP associado a MMMP-9 (BERTA e cols., 2012). E ainda, BYRNES e cols. (2006) mostraram que a LLLT produziu regeneração axonal e funcional em modelo de hemisseção de nervo lombar. E GUERRA e cols. (2012) verificaram aumento da expressão de MMP-2 e melhora da regeneração tecidual em nervo calcâneo após LLLT.

Terapia com Laser de Baixa intensidade para tratamento da DTM

Atualmente, são empregados diferentes métodos para o tratamento das dores de origem orofacial, em particular a DTM ocupa um lugar de destaque devido sua alta prevalência, e as técnicas utilizadas para o tratamento desta patologia se resumem ao emprego de antiinflamatórios, analgésicos, fisioterapia e mais recentemente o uso de terapias alternativas como ultrassom, micro-

ondas, estimulação elétrica transcutânea (TENS), acupuntura e a terapia com laser de baixa intensidade (LLLT).

O emprego de LLLT para o tratamento de enfermidades da região orofacial ocorre com bastante sucesso em clínica odontológica. Estudo de KOLEKCIOUGLU e cols. (2003) mostrou que o LLLT em grupos de paciente com DTM de origem miogênica ou artrogênica, ocorreu a melhora significativa nos movimentos de abertura bucal e lateralidade mandibular em ambos os grupos. Em acréscimo, MEDEIROS (2005) observou melhora na força de mordida de pacientes com desconforto do músculo masseter e também melhora da dor orofacial.

É demonstrado que o laser de baixa intensidade é capaz de inibir a formação de edema, da permeabilidade vascular e da hiperalgesia, após a indução de artrite em joelho de ratos, como visto no trabalho de MORAIS e cols., 2010. Além disso, pacientes submetidos ao tratamento periodontal associado a LLLT mostraram níveis mais baixos de MMP-1, TIMP-1, TGF- β 1 e fator de crescimento fibroblástico básico quando comparados àqueles sem associação a LLLT (AYKOL e cols., 2011). AVNI e cols. (2005) mostraram que ratos submetidos à isquemia do músculo gastrocnêmico seguida de estimulação fotodinâmica e posterior reperusão com sangue evidenciaram um efeito protetor no músculo impedindo sua degeneração, por meio da redução de espécies oxigênio reativa. É destacada a importante função biológica de proliferação celular, estimulada quando do uso de LLLT, como ocorre com os fibroblastos, queratinócitos, linfócitos, células de Schwann, células do músculo esquelético aórtico, células endoteliais de veias e artérias e células satélites quiescentes. Dentre os mecanismos envolvidos, estão descritos a absorção da energia emitida pela luz do laser que desencadeiam sinais intracelulares e levam a iniciação da cascata que promove a proliferação celular e a citoproteção (GAO & XING, 2009). Sabemos que a irradiação com laser é capaz de aumentar o metabolismo pela estimulação de receptores celulares e mitocondriais além de aumentar a concentração de cálcio em células do sistema nervoso (XUEJUAN e cols., 2009). E estudo em cultura com células tronco, foi demonstrado que a irradiação com laser aumentou o crescimento e melhorou a viabilidade das células (EDUARDO e cols., 2008).

Justificativa

A ação do laser de baixa intensidade não se restringe a atuação tecidual periférica, trabalhos nos mostram que LLLT pode atuar em estruturas do sistema nervoso, tais como em ramos de nervos periféricos. A ação do laser no processo de reparo do nervo ciático após sua secção foi avaliada e sua capacidade de preservação do músculo inervado, a regeneração de axonal e a cicatrização da sutura.

Em todas as análises a fototerapia de baixa intensidade associada a uma matriz guia para regeneração mostrou resultados melhores do que o grupo controle, além de evidenciar uma histomorfologia completa e compacta com aumento do tecido nervoso regenerado, no mais foi capaz de promover um ótimo microambiente para regeneração e reparo axonal durante o período de remielinização (SHEN e cols., 2013).

Em adição, é evidenciado o efeito ambíguo no tratamento com laser de baixa intensidade como descrito por REDDY (2004). O envolvimento da terapia fotodinâmica na expressão de proteínas bem como a estimulação da proliferação de cultura de células, é reconhecido, porém em altas doses mostraram que a terapia pode exercer um efeito supressivo em cultura de células satélites de ratos (REDDY, 2004). Estudo de GUERRA e cols. (2012) verificou-se que após a transecção do tendão calcâneo, há o aumento na remodelação da MEC durante o processo de cicatrização do tendão acompanhados de ativação de MMP-2 e síntese de colágeno quando submetidos ao tratamento com laser de baixa intensidade. Em contrapartida, CARVALHO e cols. (2010) mostraram que a laserterapia tem capacidade, dependente do comprimento de onda, de alterar algumas funções celulares, e dependendo da dose, a fototerapia pode inibir ou estimular algumas dessas funções.

Em suma, a utilização de LLLT é capaz de alterar a expressão de metaloproteinases da matriz em diferentes tecidos. As MMPs, por sua vez, são reconhecidas protagonistas em diversos processos, dentre eles a remodelação tecidual, processos tumorais e inflamatórios, assim como em doenças autoimunes. Também foi mostrada recentemente a atuação da LLLT na redução da expressão de MMP-2 e MMP-9 no gânglio trigeminal de ratos portadores de inflamação da articulação temporomandibular (DESIDERÁ e cols., 2015). Mas como existem conclusões controversas sobre o uso de LLLT, é de extrema importância analisar a eficácia deste tratamento, bem como sua participação via MMP sobre a modulação da nocicepção.

Objetivos

Considerando a literatura apresentada, neste trabalho avaliamos se a LLLT é capaz de alterar a expressão das MMPs e das citocinas inflamatórias no líquido sinovial das ATMs de ratos portadores de inflamação persistente intraarticular. Em uma segunda etapa foi avaliado o tipo celular (neurônios ou células gliais satélites) que expressa MMPs no gânglio trigeminal de ratos.

Para tanto tivemos os seguintes objetivos específicos:

1. Avaliar a expressão de biomarcadores inflamatórios (citocinas inflamatórias e infiltrado celular no líquido sinovial da ATM) durante o desenvolvimento da inflamação persistente induzida pela administração de Adjuvante Completo de Freund.
2. Verificar se o tratamento com LLLT em ratos com inflamação persistente da ATM altera os biomarcadores inflamatórios no líquido sinovial, bem como o aspecto histopatológico da articulação temporomandibular.
3. Analisar a expressão das MMP-2 e MMP-9 no líquido sinovial de ratos portadores de inflamação persistente da ATM.
4. Verificar se a LLLT é capaz de alterar a expressão das MMPs no líquido sinovial da ATM em ratos com inflamação persistente induzida pela administração de Adjuvante Completo de Freund.
5. Identificar por meio de técnica imunohistoquímica com co-localização a expressão das MMP-2 e MMP-9 no gânglio trigeminal identificando o tipo celular (neurônios ou células gliais satélites) em ratos portadores de inflamação persistente da ATM tratados ou não com LLLT.

Materiais e Métodos

1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos (200 a 250 gramas, n=440) cedidos pelo Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto. Os ratos foram mantidos em caixas acrílicas coletivas (4 ratos por caixa) com 1394 cm² de área, em ambiente com temperatura controlada (24 °C ± 1 °C) e ciclo claro-escuro de 12 horas (ciclo claro se iniciando às 7 horas da manhã), com água filtrada e comida *ad libitum*. Todos os protocolos experimentais foram realizados de acordo com os regulamentos e cuidados na utilização de animais de laboratório, conforme o Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA), e foram aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP (CEUA-FORP/USP n°. 2013.1.1111.58.7 – Anexo I).

2. Indução de Inflamação persistente na ATM

Para indução de inflamação persistente da articulação temporomandibular, os ratos foram anestesiados com uma injeção intramuscular de cloridrato de cetamina a 10% (75 mg/Kg) e xilasina 4%(10 mg/Kg) para permitir que fosse administrado de Adjuvante Completo de Freund (CFA) intra-articular, bilateralmente. O agente irritante, CFA, foi administrado no volume 50 µL na região da ATM, bilateralmente. Para a injeção foi utilizada uma agulha calibre 30G½ acoplada a uma seringa plástica de 1 mL. Para localização das ATMs foi realizada a palpação do arco zigomático e do côndilo para identificação do local correto da injeção. A agulha foi inserida imediatamente inferior à borda pósterio-inferior do arco zigomático e avançada em direção anterior até entrar em contato com a borda pósterio-lateral do côndilo (ZHOU e cols., 1999). No grupo controle foi realizada a administração de solução salina 0,9 % (50µL) (SAL) bilateralmente, nas ATMs, seguindo mesmo protocolo descrito. Com os ratos ainda anestesiados, após a administração do CFA ou se solução salina 0,9%, foi realizada uma sessão de LLLT (protocolo a ser descrito no item 3 de Materiais e Métodos) ou não (grupo controle-SHAM). Com o retorno da anestesia, os ratos foram levados ao Biotério I da FORP/USP.

3. *Tratamento com laser de baixa intensidade (LLLT)*

As sessões com laser de baixa intensidade (LLLT) foram realizadas com os ratos semi-contidos, para que não houvesse movimentações que interferissem na aplicação do laser. Para realização da LLLT, foi determinado um ponto de aplicação perpendicular a pele na região central do côndilo da ATM (bilateralmente). Para não ocorrer difração dos feixes de luz durante a LLLT, a região das ATMs foi submetida a raspagem dos pelos. A aplicação de LLLT foi realizada em contato com a pele do animal. A região da ATM selecionada para incidência do laser foi localizada considerando-se os mesmos parâmetros descritos para administração do CFA ou SAL intra-articular. Foi utilizado o laser de baixa intensidade (Modelo Twin Flex Evolution, marca MMOptics Ltda, São Carlos, SP, BR) com comprimento de onda de 780 nm, cujo meio ativo do emissor de luz era contínuo e constituído de gálio-alumínio-arseneto (GaAlAs), com densidade de energia equivalente a 10 J/cm^2 (potência de energia 40mW durante 10 segundos), 20 J/cm^2 (potência de energia 40mW durante 20 segundos) (DESIDERÁ e cols., 2015, DIAS e cols., 2011 e 2012), ou 60 J/cm^2 (potência de 40mW durante 60 segundos). Em cada sessão, foi realizada 1 aplicação do laser em um ponto sobre cada ATM. Foram realizadas até 5 sessões de LLLT, sendo a primeira aplicação realizada no 1º dia experimental, 2 horas após a administração intra-articular de CFA ou SAL. As demais sessões foram realizadas nos dias ímpares seguintes, ou seja, 3º, 5º, 7º e 9º dia experimental após a administração de CFA ou SAL intra-articular, respeitando-se o horário da primeira sessão de LLLT. A determinação destes períodos fundamentou-se em trabalhos anteriores, onde foi realizada a quantificação das MMP-2 e MMP-9 (NASCIMENTO e cols., 2013, DESIDERÁ e cols., 2015). No grupo controle, os ratos foram submetidos aos mesmos procedimentos para aplicação do laser, porém não foi realizada a aplicação de laser propriamente dita (sessão SHAM).

Tabela 1: Especificações para aplicação de laser de baixa intensidade.

Densidade de energia (cada aplicação)	10 J/cm^2 , 20 J/cm^2 e 60 J/cm^2 *
Densidade de energia ao final de 5 sessões	2J, 4J e 12J, respectivamente
Área de aplicação	0.04 cm^2
Potência/ Energia	0.4J, 0.8J e 2.4J, respectivamente
Tempo de aplicação	10s, 20s ou 60s, respectivamente
Modo de Emissão	Contínuo
Comprimento de onda	780nm
Meio emissor de luz	Gálio-Alumínio-Arseneto
Contato com a superfície	Direto

*As densidades de energia aplicadas são estipuladas em J/cm^2 e a potência (mW) é constante variando apenas a frequência ou tempo de aplicação de acordo com a fórmula:

$$\text{Energia (Joules/J)} = \text{potência (Watts/W)} \times \text{Tempo (segundos/s)}$$

Equação 1: Fórmula para cálculo da densidade de energia (J) a partir da energia (W) e tempo (s) aplicados.

4. *Coleta do líquido sinovial*

Após o tempo de sobrevida seguida da injeção de CFA ou SAL intraarticular, os ratos foram submetidos à eutanásia por meio de sobredose anestésica de cloridrato de cetamina a 10% (225 mg/Kg) e xilasina 4% (30 mg/Kg) e decaptados. Este procedimento foi executado em quatro períodos diferentes (1, 3, 7 e 10 dias) após a indução da inflamação nos ratos submetidos à LLLT ou não (Controle). Os tecidos superficiais foram dissecados e o espaço articular foi exposto. A região de cápsula articular foi lavada por meio da técnica de bombeamento e aspiração utilizando EDTA em solução salina 0,9 % tamponada (PBS), totalizando um volume de 50 μL por ATM. Esta lavagem foi realizada duas vezes e teve como objetivo a coleta do líquido sinovial.

5. *Análise de mieloperoxidase (MPO)*

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima que se encontra principalmente nos grânulos dos neutrófilos e tem sido utilizada extensivamente como um marcador bioquímico de infiltração de granulócitos em vários tecidos. No presente estudo a MPO foi quantificada no líquido sinovial da ATM nos períodos de 1, 3, 7 e 10 dias após a injeção de CFA intraarticular. Um volume de 20 μL do líquido sinovial foi centrifugado a 4.500 rpm durante 5 minutos a 4°C. Este líquido foi ressuspensionado em 50 μL de tampão de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) e homogeneizado por 5 minutos. Plaqueou-se então o líquido com uma solução de leitura contendo dicloridrato de o-dianisidina e peróxido de hidrogênio a 1 %. Para a leitura, utilizou-se absorvância de 450 nm e os resultados foram descritos em unidades de MPO / líquido articular. Uma unidade de MPO é definida como a conversão de 1 μmol de peróxido de hidrogênio em 1 min a 22°C.

6. *Análise da expressão de metaloproteinases da matriz no líquido sinovial por meio de zimografia convencional*

O zimograma permite visualizar diferentes isoformas de uma enzima ou das formas próenzima e enzima ativa, que são muito frequentes em enzimas proteolíticas extracelulares, como as MMPs. A zimografia foi realizada aplicando-se 20 µg de proteína do extrato descrito no item 4, o qual foi misturado com tampão de amostra não redutor para a corrida. Esse extrato foi utilizado para a zimografia no máximo uma semana após a extração, pois sua atividade pode diminuir ao longo do tempo. O gel utilizado foi feito no laboratório contendo polacrilamida a 12 % e gelatina a 0,1 % no gel de corrida (detalhes da confecção de zimogramas estão na forma de filme no site da FORP, no link Videoteca, www.forp.usp.br).

Após a corrida, os zimogramas foram submetidos a dois banhos de solução renaturante de Triton X-100 a 2 %. O gel foi incubado em tampão Tris-CaCl₂ por 18 horas a temperatura de 37°C. Em seguida o gel foi corado pelo corante Comassie Blue G-250 e descorado com uma solução de metanol e ácido acético. Os géis obtidos foram fotografados no aparelho UltraVioleta da Leica e a quantificação das MMP-2 e MMP-9 foi realizada através do programa Genetools 4.1.

7. *Biomarcadores inflamatórios*

Amostras obtidas através da técnica descrita no item 4 foram utilizadas para realização do teste para detecção de biomarcadores inflamatórios. A mensuração dos níveis desses mediadores foi realizada utilizando kits de dosagem de citocinas Bio-Plex Pro™ Assays (Bio-Rad), o qual quantifica 12 citocinas, especificamente, IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-13, IFN-γ, GM-CSF e TNF-α. Dentre as citocinas avaliadas podemos destacar algumas envolvidas na instalação do processo inflamatório, como IL-1 e TNF-α, e outras na manutenção do mesmo, como a IL-12p70 e GM-CSF. Ainda, elas podem ser classificadas entre pró-inflamatórias (IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-12p70, IFN-γ, GM-CSF e TNF-α.) e anti-inflamatórias (IL-4, IL-10, IL-13). A curva padrão é fornecida pelo fabricante, sendo necessário analisar suas concentrações para definir os padrões para análise. A análise da reação foi realizada pelo leitor Luminex, o qual realiza a leitura através de feixes de laser que emitem cores diferentes para cada citocina analisada, as quais são ligadas as chamadas beads (microesferas fluorescentes) que emitem diferentes cores.

8. *Remoção do gânglio trigeminal*

Para obtenção do gânglio trigeminal, os ratos foram anestesiados com a associação de cloridrato de cetamina a 10 % (75 mg/Kg) com xilasina 4 % (10 mg/Kg), e submetidos à perfusão transcardíca com a passagem de 250mL de solução salina tamponada PBS 0.1 M e seguida de 250 mL de paraformaldeído 4 % (PFA 4 %), nos períodos de 1, 3, 7 e 10 dias após aplicação de CFA ou SAL na ATM e submetidos ou não a LLLT. A determinação destes períodos fundamentou-se no mesmo parâmetro de irradiação com LLLT, a fim de verificar como a fototerapia atua sobre a expressão de metaloproteinases.

9. *Imunohistoquímica*

As amostras de gânglio trigeminal foram fixadas em PFA 4 % e cortes histológicos de 12µm foram utilizados para técnica de imunohistoquímica. Primeiramente, foi realizada a lavagem com PBS 0,01 M (3x) depois foi feito o bloqueio com 1 % de soro normal de cabra diluído em PBS 0,01 M acrescido de Triton 1 %, que foi incubado durante 1 hora (aproximadamente 37°C). Em seguida, lavado com solução de PBS 0,01 M (ph 7,4) (3x) e os cortes foram incubados com anticorpos primários anti-MMP-2 (1:500) e anti-MMP-9 (1:500) assim como o anticorpo anti-GFAP (1:10000) e anti-IBa-1 (1:1000). Primeiramente foi feita a marcação de MMP. Anticorpos primários foram diluídos conforme testes de diluição, feitos previamente a partir das recomendações do fabricante. As incubações com os anticorpos primários foram feitas durante 1 hora a 37°C. Posteriormente, efetuou-se a lavagem com PBS 0,01 M (3x) e seguiu-se a incubação com anticorpo secundário marcado com rodhamina, diluído segundo as recomendações do fabricante, durante 30 minutos à temperatura ambiente. Novamente procedeu-se a lavagem das lâminas com PBS 0,01 M (3x). Após, foram processadas segundo a técnica de dupla-marcação para imunofluorescência com incubação overnight a 4°C com anticorpo monoclonal anti-GFAP 1:10000 (Chemicon International) ou anticorpo policlonal anti-Iba1 1:1000 (Wako). Após incubação com os anticorpos primários, os cortes foram lavados em PBS 0,01 M (3x) e, posteriormente, incubados à temperatura ambiente por 1 hora com Alexa flúor® 488 goat anti-rabbit IgG 1:1000 (Sigma Aldrich). Controles foram realizados omitindo os anticorpos primários. Os cortes foram lavados em PBS 0,01 M (3x), e incubados com DAPI 1:12000 (Sigma Aldrich). Em seguida, foram lavados (PBS 0,01 M – 3x) e cobertos por lamínulas com meio de montagem Vectashield® (Vector).

Após estes procedimentos as lâminas foram fotografadas com microcópico de luz polarizada (Zeiss). As imagens obtidas foram então analisadas pelo programa ImageJ (ImageJ Launcher versão 2006.02.01- Copyright 1993-2006, Broken Symetry Software).

10. Histologia da articulação temporomandibular

Após a coleta do líquido sinovial, a articulação temporomandibular foi removida e realizou-se a coloração de hematoxilina e eosina (H&E) em lâminas contendo cortes de 5 µm de espessura com o intuito de pesquisar o infiltrado inflamatório presente nesta região após a aplicação de CFA ou SAL intraarticular seguida de exposição ou não a LLLT.

As peças foram, para tanto, descalcificadas em solução de ETDA. O ETDA é composto por uma associação de ácido clorídrico (12 %), EDTA (0,07 %), tartarato de sódio (0,014%), tartarato de sódio e potássio (0,8 %) e água destilada (q.s.p. 1000 mL) (CASTANIA e cols., 2014). O armazenamento em solução de ETDA se deu até que as peças estivessem maleáveis o suficiente. Em seguida, realizada a desidratação das peças, para enfim serem incluídas em parafina para confecção de lâminas.

11. Eutanásia

Ao término dos períodos de 1, 3, 7 e 10 dias os animais foram submetidos à eutanásia por meio de anestesia com a associação de cloridrato de cetamina a 10 % (75mg/Kg) com xilasina 4 % (10 mg/Kg), seguida de decaptação, ou perfusão transcardíaca.

12. Análise dos Resultados

A análise estatística para verificação de diferenças entre os grupos SAL, CFA, SAL+LASER e CFA+LASER para os testes de MPO, zimografia, histologia da ATM, expressão de citocinas, imunofluorescência para marcação de MMP-2 e MMP-9 foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA) de duas vias. Quando possível, foi realizado o teste post hoc de Newman-Keuls, considerando para significância $P < 0,05$.

13. Grupos Experimentais

Grupo 1 Controle (n = 12, para cada período experimental): ratos foram sacrificados sem manipulações prévias para obtermos um controle negativo para a amostra.

Grupo 2 SAL (n = 12, para cada período experimental): os ratos foram anestesiados e receberam a aplicação de SAL nas ATMs seguida de sessão SHAM de LLLT, este procedimento foi repetido nos dias ímpares subsequentes. Os animais foram então sacrificados para coleta do líquido sinovial 1º, 3º, 7º e 10º dia após administração intraarticular de SAL, para análise da atividade de mieloperoxidase, MMP-2 e MMP-9, expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias.

Grupo 3 SAL + LASER (n = 12, para cada período experimental): os ratos foram anestesiados e receberam a aplicação de salina 0,9% nas ATMs seguida de sessões de LLLT com dose de 10 J/cm², 20 J/cm² ou 60 J/cm², este procedimento foi repetido nos dias ímpares subsequentes. Os animais foram então sacrificados para coleta do líquido sinovial 1º, 3º, 7º e 10º dia após administração intraarticular de SAL, para análise da atividade de mieloperoxidase, MMP-2 e MMP-9, expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias.

Grupo 4 CFA (n = 12, para cada período experimental): os ratos foram anestesiados e receberam a aplicação de CFA nas ATMs seguida de sessão SHAM de LLLT, este procedimento foi repetido nos dias ímpares subsequentes. Os animais foram então sacrificados para coleta do líquido sinovial 1º, 3º, 7º e 10º dia após administração de CFA intraarticular, para análise da atividade de mieloperoxidase, MMP-2 e MMP-9, expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias.

Grupo 5 CFA + LASER (n = 12, para cada período experimental): ratos foram anestesiados e receberam a administração de CFA nas ATMS, após foi realizada sessões de LLLT dose de 10 J/cm², 20J/cm² ou 60J/cm², este procedimento foi repetido nos dias ímpares subsequentes. Os animais foram então sacrificados para coleta do líquido sinovial 1º, 3º, 7º e 10º dia após administração intraarticular de CFA, para análise da atividade de mieloperoxidase, MMP-2 e MMP-9, expressão de citocinas pró e anti-inflamatória.

Resultados

1. Análise de mieloperoxidase

A atividade oxidativa avaliada pelo teste de MPO foi alterada pela aplicação de LLLT nas doses empregadas neste estudo (10 J/cm^2 , 20 J/cm^2 e 60 J/cm^2 , Figura 5). Foi realizada análise estatística ANOVA de duas vias para os grupos com aplicação de laser com dose de 60 J/cm^2 , e verificou-se diferença significativa no tratamento ($F_{3,95} = 48,71$; $P < 0,001$) assim como interação entre tempo e tratamento ($F_{9,95} = 11,35$; $P < 0,001$). Ainda, foi visualizada diferença entre os grupos de CFA+LASER e os grupos CFA, SAL e SAL+LASER nos períodos de 1, 3 e 7 dias. No mais, no período de 10 dias o grupo CFA foi diferente de SAL e CFA+LASER.

A análise estatística TWO-WAY ANOVA evidenciou para os resultados da análise de MPO no líquido sinovial diferença no tempo ($F_{3,23} = 95277,59$; $P < 0,001$), tratamento ($F_{3,23} = 22995,6$; $P < 0,001$) bem como interação entre esses fatores ($F_{9,23} = 18806,2$; $P < 0,001$). O teste de Newman-Keuls ($P < 0,05$) verificou diferença estatisticamente significativa entre o grupo CFA e os demais grupos, CFA+LASER, SAL e SAL+LASER, nos períodos de 1, 3, 7 e 10 dias. Em acréscimo não foram visualizadas diferenças entre o grupo CFA+LASER e os grupos SAL e SAL+LASER.

A análise estatística TWO-WAY ANOVA evidenciou para os resultados da análise de MPO no líquido sinovial, para o tratamento com laser de baixa intensidade e dose de 10 J/cm^2 , diferença no tempo ($F_{3,71} = 573,45$; $P < 0,001$), tratamento ($F_{3,71} = 115,6$; $P < 0,001$) bem como interação entre esses fatores ($F_{9,71} = 110,13$; $P < 0,001$). O teste de Newman-Keuls ($P < 0,05$) verificou diferença estatisticamente significativa entre o grupo CFA e os demais grupos, CFA+LASER, SAL e SAL+LASER, nos períodos de 1, 3, 7 e 10 dias. No mais, não houveram diferenças apontadas pelo teste estatístico entre os grupos CFA+LASER, SAL e SAL+LASER em nenhum dos períodos analisados.

Figura 5: Gráficos de Atividade oxidativa (µg/µL). Resultados obtidos a partir de amostras de animais tratados com LLLT com dose de 10 J/cm², 20 J/cm² e 60 J/cm². Em (*) o grupo CFA foi diferente dos demais grupos dentro do mesmo período, teste de Newman-Keuls. (a) o grupo CFA é diferente dele mesmo quando comparado aos períodos de 1 e 3 dias, teste de Newman-Keuls. **Fonte:** autoria própria.

2. Análise da expressão de metaloproteinases da matriz no líquido sinovial – Zimografia convencional

A aplicação da Two-way ANOVA apontou diferença no fator tratamento dos diferentes grupos quanto a expressão de MMP-9 ($F_{4,71}= 2,815$; $P < 0,05$). O teste *post hoc* test Student Newman-Keuls ($P < 0,05$) no período de 1, 3, 7 e 10 dias o grupo CFA foi estatisticamente diferente ($P < 0,05$) dos grupos SAL e SAL+LASER. Ainda o grupo CFA foi diferente de CFA+LASER ($P < 0,05$) no período de 10 dias após indução da inflamação. Já o grupo CFA+LASER foi diferentes dos grupos SAL e SAL+LASER nos períodos de 1, 3 e 7 dias (Figura 6).

Para expressão de MMP-2 com peso molecular de 75 kDa foi verificado diferença estatisticamente significativa no fator tratamento ($F_{4,71}=3,598$; $P < 0,01$). Os grupos CFA e CFA+LASER mostraram diferença significativa ($P < 0,05$, Newman-Keuls) quando comparados aos grupos SAL e SAL+LASER nos períodos de 1 e 7 dias. O grupo CFA foi diferente dos demais grupos no período de 10 dias após indução da inflamação ($P < 0,05$, Newman-Keuls). Mas não verificou-se diferenças estatísticas entre os grupos analisados.

A análise estatística para expressão de MMP-2 (72 kDa) mostrou diferença significativa no fator tratamento ($F_{4,71}= 3.106$, $P < 0,05$). Nos períodos de 1, 3 e 7 dias, os grupos CFA e CFA+LASER mostraram diferença estatisticamente significativa quando comparados aos grupos

SAL e SAL+LASER ($P < 0,05$, Newman-Keuls). Ainda, o grupo CFA foi diferente dos demais grupos no período de 10 dias após a indução da inflamação.

O teste Two-way ANOVA mostrou diferença significativa quando analisado o fator tratamento na expressão da MMP-2 (64 kDa) ($F_{4,71} = 3,282$; $P < 0,05$). Nos períodos de 1, 7 e 10 dias foi evidenciado diferença significativa entre os grupos CFA e CFA+LASER quando comparados aos grupos SAL e SAL+LASER ($P < 0,05$, Newman-Keuls). Mas não foi verificada diferença entre os diferentes tratamentos no período de 3 dias.

Figura 6: Fotografia de zimogramas representativos de líquido sinovial de ratos submetidos ou não a LLLT 60 J/cm² para os períodos de sobrevivência de 1, 3, 7 e 10 dias. Gráficos de Expressão das gelatinases MMP-2 e MMP-9. A gelatinase MMP-2 foi analisada em seus diferentes pesos moleculares, 64kDa ou forma inativa, 72kDa ou forma ativa, 75kDa ou forma pró-ativa. Em (a) o grupo CFA+LLLT

foi diferente de SAL ($P < 0.05$, Newman-Keuls). (*) o grupo CFA foi diferente dos grupos SAL e SAL+LASER ($P < 0.05$, Newman-Keuls). (b) o grupo CFA foi diferente de CFA+LASER. **Fonte:** autoria própria.

A aplicação da análise estatística (TWO-WAY ANOVA) para amostras de animais que receberam tratamento de laser com dose de 20 J/cm^2 , evidenciou que a expressão de MMP-9 (95 kDa) teve diferença no tratamento ($F_{3,79}=14,137$; $P < 0,001$). O teste *post-hoc* Newman-Keuls apontou diferença do grupo CFA quando comparado com os grupos Controle, SAL, SAL+LASER e CFA+LASER ($P < 0,001$; Newman-Keuls). Em particular, encontrou-se diferença significativa nos períodos de 3 e 7 dias de experimentação na expressão da MMP-9 no gânglio trigeminal do grupo CFA comparado com os grupos Controle, SAL, SAL+LASER e CFA+LASER.

Considerando a análise da expressão da MMP-2, no gânglio trigeminal, em seus diferentes pesos (75 kDa, 72 kDa e 64 kDa), a aplicação da TWO-WAY ANOVA para MMP-2 (75kDa) evidenciou diferença estatística no tratamento ($F_{4,79}=14,189$; $P < 0,001$) e interação entre tempo e tratamento ($F_{12,79}=2,938$; $P < 0,05$). O teste *post hoc* de Newman-Keuls mostrou diferença na expressão de MMP2 (75 kDa) do grupo CFA no período de 1, 3 e 10 dias quando comparado aos grupos Controle, SAL e SAL+LASER e CFA+LASER (Figura 7).

Para a MMP-2 (72 kDa), observa-se diferença estatística (TWO-WAY ANOVA) considerando o fator tratamento ($F_{4,79}=36,192$, $P < 0,001$) mas não se observou interação tempo - tratamento. Em particular, a expressão da MMP-2 (72 kDa) no líquido sinovial no grupo CFA foi diferente significativamente ($P < 0,05$; Newman-Keuls) quando comparado aos grupos Controle, SAL e SAL+LASER e CFA+LASER nos períodos 1, 3, 7 e 10 dias. Adicionalmente, o grupo CFA+LASER apresentou diferença quanto a expressão de MMP-2 (72 kDa) comparado aos grupos Controle, SAL, SAL+LASER, no período de 3 e 7 dias de experimentação.

Ainda, para a MMP-2 (64 kDa) a aplicação TWO-WAY ANOVA apontou diferença estatística quanto ao tratamento ($F_{4,79}=15,553$; $P < 0,001$). O teste de Newman-Keuls evidenciou que a expressão de MMP-2 (64 kDa) do grupo CFA foi diferente ($P < 0,05$) quando comparado os grupos Controle, SAL, SAL+LASER e CFA+LASER nos períodos de 1, 3 e 10 dias. No mais, não houve diferença entre o grupo CFA+LASER e os grupos Controle, SAL e SAL+LASER em todos os períodos analisados (1, 3, 7 e 10 dias).

Figura 7: Fotografia de zimograma representativo para amostras de líquido sinovial de ratos tratados ou não com LLLT com dose de 20 J/cm², para os períodos de sobrevida de 1, 3, 7 e 10 dias. Gráficos de Expressão das gelatinases MMP-2 e MMP-9. A gelatinase MMP-2 foi analisada em seus diferentes pesos moleculares, 64kDa ou forma inativa, 72kDa ou forma ativa, 75kDa ou forma pró-ativa (a) quando o grupo CFA+LLLTT foi diferente de SAL e SAL+LLLTT (P < 0.05, Newman-Keuls). (*) quando o grupo CFA foi diferente dos demais grupos (P < 0.05, Newman-Keuls). **Fonte:** autoria própria.

Aplicação de LLLT com dose de 10 J/cm² mostrou em seus resultados diferença significativa no tratamento para os diferentes pesos moleculares da MMP-2 e para MMP-9.

Para MMP-9 (95 kDa), a análise estatística estatística (TWO-WAY ANOVA) evidenciou diferença no tratamento ($F_{4,41} = 11,73$; $P < 0,001$;), mas não se verificou diferença no tempo ou

interação entre os fatores. A aplicação do *post hoc* teste de Newman-Keuls ($P < 0,05$) mostrou que o grupo CFA foi diferente dos grupos CFA+LASER, SAL+LASER, SAL e CONTROLE (Figura 8). Em contrapartida não houve diferenças entre o grupo CFA+LASER e os grupos SAL+LASER, SAL e CONTROLE.

Os valores MMP-2 (75 kDa), quando submetidos ao teste estatístico TWO-WAY ANOVA, mostraram diferença no tratamento ($F_{4,41} = 14,15$; $P < 0,001$). Ainda, o *post test* Newman-Keuls ($P < 0,05$) mostrou que o grupo CFA foi diferente dos grupos CFA+LASER, SAL+LASER, SAL e CONTROLE.

Para a MMP-2 (72 kDa), foi verificada diferença no tratamento ($F_{4,41} = 21,46$; $P < 0,001$), no entanto não foi evidenciada diferença no tempo ou interação entre os fatores. Assim como a MMP-2 75kDa, não foi apontada diferença entre o grupo CFA+LASER e os grupos controles, embora tenha sido verificada diferença significativa entre o grupo CFA e os grupos CFA+LASER, SAL+LASER, SAL e CONTROLE ($P < 0,05$; Newman-Keuls).

A análise estatística TWO-WAY ANOVA seguida pelo *post test* de Newman-Keuls, mostrou para a MMP-2 (64 kDa), diferença no tratamento ($F_{4,41} = 4,99$, $P < 0,05$) mas não no tempo ou mesmo a interação entre os fatores. No mais, o grupo CFA diferiu dos grupos CFA+LASER, SAL+LASER, SAL e CONTROLE (teste de Newman-Keuls, $P < 0,05$; Figura 8).

Figura 8: Fotografia de zimograma representativo para amostras de líquido sinovial de ratos tratados ou não com LLLT com dose de 10 J/cm², para os períodos de sobrevivência de 1, 3, 7 e 10 dias. Gráficos de Expressão das gelatinases MMP-2 e MMP-9. A gelatinase MMP-2 foi analisada em seus diferentes pesos moleculares, 64kDa ou forma inativa, 72kDa ou forma ativa, 75kDa ou forma pró-ativa. Em (a) quando o grupo CFA+LLLTT foi diferente do grupo SAL e SAL+LLLTT. E em (*) quando o grupo CFA foi diferente dos demais grupos. Amostras de líquido sinovial de ratos de diferentes períodos experimentais, 1, 3, 5, 7 e 10 dias após a administração de Adjuvante Completo de Freund (CFA) ou solução salina 0,9 % (SAL), bilateral na região das ATMs, e ainda que foram ou não submetidos a LLLT de baixa intensidade – 10 J/cm². **Fonte:** autoria própria.

3. Dosagem de Citocinas pró e anti-inflamatórias

A dosagem de citocinas foi realizada em amostras de líquido sinovial coletado de ratos dos diferentes grupos experimentais, submetidos ou não à LLLT. As dosagens foram realizadas em duas

etapas, e em cada etapa foi analisada amostras de todos os diferentes grupos. Como descrito no kit comercial Bio-Plex Pro™ Assays (Bio-Rad), a curva de normalização foi realizada e a dosagem das amostras foi feita com auxílio do leitor do Luminex. Os resultados obtidos mostram que a LLLT alterou a expressão das citocinas no líquido sinovial de ratos portadores de inflamação persistente das ATMs (Figuras 9).

Análise de Citocinas Pró-inflamatórias

A análise para a citocina pró-inflamatória IL-1 α mostrou não haver diferença entre os diferentes tratamentos (SAL, CFA, SAL+LASER e CFA+LASER) e doses de laser empregadas (60 J/cm², 20 J/cm² e 10 J/cm²) (Figura 9).

Figura 9: Gráficos de dosagem da citocina IL-1 α (pg/mL). Gráficos correspondentes às leituras de IL-1 α (pg/mL) para os tratamentos nas doses de laser de 10 J/cm², 20 J/cm² e 60 J/cm². **Fonte:** autoria própria.

Considerando a IL-1 β , outra citocina pró-inflamatória reconhecidamente envolvida no processo de instalação da inflamação, mostrou diferença significativa para o tratamento com laser de 20J/cm² no fator tempo ($F_{3,61} = 2,453$; $P < 0,05$; Newman-Keuls), tratamento ($F_{3,61} = 2,515$; $P < 0,05$; Newman-Keuls) e interação entre os fatores ($F_{9,61} = 2.548$, $P < 0,05$; Newman-Keuls), mas não para as doses de 60J/cm² e 10J/cm². No período de 1 dia após a indução da inflamação foi verificado diferença entre o grupo CFA e os grupos SAL, SAL+LASER e CFA+LASER. Também dentro do grupo CFA, foi visualizado diferença entre o período de 1 dia e os demais períodos (3, 7 e 10 dias). (Figura 10)

Figura 10: Gráficos de dosagem da citocina IL-1β (pg/mL). Gráficos correspondentes as leituras de IL-1β (pg/mL) para os tratamentos das doses de laser de 10 J/cm², 20 J/cm² e 60 J/cm². (*) o grupo é diferente dos demais grupos no respectivo período. **Fonte:** autoria própria.

Para a citocina IL-2, a aplicação da ANOVA de duas vias apontou diferença significativa para os tratamentos empregados e as 3 doses de laser. Com relação a dose de 60J/cm², verificamos diferença significativa no fator tratamento ($F_{3,57}=3,882$; $P < 0,05$; Newman-Keuls) mas não no fator tempo ou interação entre eles. O grupo SAL+LASER foi diferente dos demais grupos (SAL, CFA, CFA+LASER) no período de 3 dias. Para a dose de 20 J/cm², também foram encontradas diferenças nos fatores tempo ($F_{3,57}= 4,484$; $P < 0,05$; Newman-Keuls), tratamento ($F_{3,57}= 5,832$; $P < 0,05$; Newman-Keuls), bem como, interação entre eles ($F_{9,57}= 5,643$; $P < 0,05$; Newman-Keuls). Foi visto que o grupo SAL+LASER foi diferente dos demais grupos ($P < 0,05$; Newman-Keuls), em destaque, essa diferença foi evidenciada dentro do período de 10 dias após o início dos experimentos (Figura 11). Ainda, dentro do próprio grupo SAL+LASER foi evidenciado diferença entre o período de 10 dias e os demais períodos (1, 3 e 7 dias, $P < 0,05$; Newman-Keuls). Da análise da dose de 10J/cm², foi verificada diferença estatisticamente significativa nos fatores tempo ($F_{3,56}= 5,639$; $P < 0,05$; Newman-Keuls), tratamento ($F_{3,56}= 24,661$; $P < 0,05$; Newman-Keuls), e, ainda, interação entre eles ($F_{9,56}= 3,955$; $P < 0,05$; Newman-Keuls). O grupo SAL+LASER foi diferente dos demais grupos nos períodos de 1, 3 e 10 dias ($P < 0,05$, Newman-Keuls). No mais, dentro do grupo SAL+LASER verificamos diferença entre os períodos de 7 dias quando comparados aos demais ($P < 0,05$, Newman-Keuls) (Figura 11)

Figura 11: Gráficos de dosagem da citocina IL-2 (pg/mL). Gráficos correspondentes às leituras de IL-2 para os tratamentos das doses de laser de 10 J/cm², 20J/cm² e 60J/cm². (*) o grupo é diferente dos demais dentro do período (P < 0,05; Newman-Keuls). (a) o respectivo grupo foi diferente dele mesmo quando comparado aos demais períodos (P < 0,05; Newman-Keuls). **Fonte:** autoria própria.

Considerando a citocina IL-5 a aplicação da análise de variância de duas vias mostrou diferença significativa para os tratamentos e diferentes doses empregadas (Figura 12). Na dose de 10 J/cm² foi evidenciada diferença estatisticamente significativa nos fatores tempo ($F_{3,55}=4,761$; $P < 0,05$, Newman-Keuls), tratamento ($F_{3,55}= 11,051$, $P < 0,001$, Newman-Keuls), e interação entre eles ($F_{9,55}= 3,074$; $P < 0,05$, Newman-Keuls). O grupo SAL+LASER foi diferente dos grupos SAL, CFA e CFA+LASER no período de 1 dia, e no período de 10 dias o grupo SAL foi diferente dos demais grupos. Dentro do grupo SAL houve diferença entre o período de 10 dias quando comparado aos períodos de 1, 3 e 7 dias. E no grupo SAL+LASER o período de 1 dia foi diferente quando comparado aos períodos de 3, 7 e 10 dias. Para o tratamento com dose de laser de 20 J/cm² a análise estatisticamente mostrou diferença no fator tempo ($F_{3,57}= 3,914$; $P < 0,05$, Newman-Keuls), tratamento ($F_{3,57}= 13,102$; $P < 0,001$, Newman-Keuls) e interação entre eles ($F_{9,57}= 3,304$; $P < 0,05$; Newman-Keuls). O grupo SAL foi diferente dos demais grupos dentro do período de 10 dias de experimentação, assim com dentro do próprio grupo SAL quando comparado o período de 10 dias aos períodos de 1, 3 e 7 dias. Na análise da dose de laser de 60 J/cm² o fator tempo mostrou diferença significativa ($F_{3,57}= 7,504$, $P < 0,001$, Newman-Keuls). O grupo SAL foi diferente de CFA, SAL+LASER e CFA+LASER no período de 10 dias, e, ainda, SAL mostrou diferença quando comparado o período de 10 dias e os períodos de 1, 3 e 7 dias ($P < 0,05$; Newman-Keuls) (Figura 12).

Figura 12: Gráficos de dosagem da citocina IL-5 (pg/mL). Gráficos correspondentes às leituras de IL-5 para os tratamentos das doses de laser de 10 J/cm², 20 J/cm² e 60 J/cm². (*) o grupo é diferente dos demais dentro do respectivo período ($P < 0,05$; Newman-Keuls). (#) o respectivo grupo foi diferente dos grupos CFA e CFA+LASER ($P < 0,05$; Newman-Keuls). **Fonte:** autoria própria.

Para a citocina pró-inflamatória IL-6, na dose de 20J/cm², a aplicação da TWO-WAY ANOVA não mostrou diferença significativa entre os tratamentos. Para a dose de 60 J/cm² foi verificada diferença entre os fatores tempo ($F_{3,57} = 3,979$; $P < 0,05$), tratamento ($F_{3,57} = 4.275$, $P < 0,05$) e também interação entre os fatores analisados ($F_{9,57} = 3.834$, $P < 0,05$). O grupo CFA+LASER foi diferente dos grupos SAL, CFA e SAL+LASER no período de 1 dia após o início dos experimentos ($P < 0,05$; Newman-Keuls). E no período de 1 dia o grupo CFA+LASER mostrou diferença quando comparado aos períodos de 3, 7 e 10 dias ($P < 0,05$; Newman-Keuls – Figura 13). Quando a análise do tratamento com a dose de laser de 10J/cm² foi evidenciado diferença nos fatores tempo ($F_{3,55} = 5,089$; $P < 0,05$), tratamento ($F_{3,55} = 30,324$; $P < 0,001$), bem como interação entre eles ($F_{9,55} = 4.036$, $P < 0,001$). Foi verificada diferença entre o grupo SAL+LASER e os grupos SAL, CFA e CFA+LASER nos períodos de 1, 3 e 10 dias. No grupo de SAL+LASER observou-se diferença significativa entre o período de 10 dias quando comparado aos períodos de 1, 3 e 7 dias. (Figura 13)

Figura 13: Gráficos de dosagem da citocina IL-6 (pg/mL). Gráficos correspondentes às leituras de IL-6 para os tratamentos das doses de laser de 10 J/cm², 20J/cm² e 60J/cm². (*) o grupo é diferente dos demais dentro do período ($P < 0,05$; Newman-Keuls). a* indica diferença entre CFA e CFA+LASER no Dia 1.

0,05; Newman-Keuls). (a) o respectivo grupo foi diferente dele mesmo quando comparado aos demais períodos ($P < 0,05$; Newman-Keuls). **Fonte:** autoria própria.

Para a análise da citocina IL-12p70, o teste estatístico ANOVA de duas vias mostrou, para o tratamento com laser na dose de 60 J/cm^2 , diferença significativa no fator tratamento ($F_{3,57} = 9,494$; $P < 0,001$) mas não no fator tempo. O grupo SAL+LASER foi diferente dos demais grupos no período de 3 e 7 dias após a indução da inflamação e tratamento ou não de laser. O tratamento com dose de 20 J/cm^2 mostrou, através da análise estatística TWO-WAY ANOVA, diferença significativa no fator tempo ($F_{3,57} = 9,533$; $P < 0,001$), tratamento ($F_{3,57} = 11,840$; $P < 0,001$), e, ainda, interação entre eles ($F_{9,57} = 6,829$; $P < 0,001$). O grupo SAL+LASER foi diferente dos grupos SAL, CFA e CFA+LASER no período de 10 dias, e, ainda, SAL+LASER teve diferença dentro do grupo quando comparado o período 10 dias aos períodos de 1, 3 e 7 dias. ($P < 0,05$; Newman-Keuls - Figura 14). No mesmo sentido, a dose de 10 J/cm^2 mostrou diferença significativa no fator tempo ($F_{3,55} = 17,463$; $P < 0,001$), tratamento ($F_{3,55} = 24,979$; $P < 0,001$), bem como interação entre eles ($F_{9,55} = 13,895$; $P < 0,001$). No período de 3 dias, o grupo SAL+LASER foi diferente dos grupos SAL, CFA e CFA+LASER ($P < 0,05$; Newman-Keuls). E no período de 10 dias, CFA foi diferente de SAL e SAL+LASER foi diferente de SAL e CFA+LASER ($P < 0,05$; Newman-Keuls).

Figura 14: Gráficos de dosagem da citocina IL-12p70 (pg/mL). Gráficos correspondentes às leituras de IL-12p70 para os tratamentos das doses de laser de 10 J/cm^2 , 20 J/cm^2 e 60 J/cm^2 . Em (*) o grupo é diferente dos demais dentro do período ($P < 0,05$; Newman-Keuls). (a) o respectivo grupo foi diferente dele mesmo quando comparado aos demais períodos ($P < 0,05$; Newman-Keuls). **Fonte:** autoria própria.

Para a citocina TNF- α , a análise estatística ANOVA de duas vias mostrou diferença significativa no fator dose ($F_{1,78} = 6,005$; $P < 0,05$) mas não nos fatores tempo e tratamento. O grupo CFA foi diferente dos demais grupos no período de 1 dia após a indução da inflamação (Figura 15).

Figura 15: Gráficos de dosagem da citocina TNF- α (pg/mL). Gráficos correspondentes às leituras de TNF- α para os tratamentos das doses de laser de 10 J/cm², 20 J/cm² e 60 J/cm². (*) o grupo é diferente dos demais dentro do período ($P < 0,05$; Newman-Keuls). (a) o respectivo grupo foi diferente dele mesmo quando comparado aos demais períodos ($P < 0,05$; Newman-Keuls). (b) o grupo foi diferente do grupo SAL no período de 7 dias ($P < 0,05$; Newman-Keuls). (#) quando SAL foi diferente de CFA e SAL+LASER ($P < 0,05$; Newman-Keuls). **Fonte:** autoria própria.

Para o tratamento com dose de 60 J/cm², a análise estatística, Two-way ANOVA, mostrou diferença na expressão da citocina GM-CSF para os diferentes grupos no fator tratamento ($F_{3,57} = 6,221$; $P < 0,001$). O grupo SAL+LASER foi diferente dos demais grupos no período de 3 dias, e ainda esse mesmo período foi diferente dos períodos de 1 e 10 dias dentro do grupo SAL+LASER ($P < 0,05$; Newman-Keuls). Para o tratamento com laser na dose de 20 J/cm² não foram verificadas diferenças significantes entre os grupos nos períodos analisados. Para a dose de 10 J/cm² foi evidenciada diferença entre os fatores tempo ($F_{3,55} = 3,657$; $P < 0,05$), tratamento ($F_{3,55} = 9,455$; $P < 0,001$), bem como, interação entre eles ($F_{9,55} = 3,393$; $P < 0,05$). O grupo SAL+LASER mostrou diferença entre os demais grupos no período de 10 dias, e entre os períodos de 1, 3 e 7 dias no grupo de SAL+LASER ($P < 0,05$; Newman-Keuls - Figura 16).

Figura 16: Gráfico de dosagem da citocina GM-CSF (pg/mL). Gráficos correspondentes às leituras de GM-CSF para os tratamentos das doses de laser de 10 J/cm², 20 J/cm² e 60 J/cm². (*) o grupo é diferente dos demais dentro do respectivo período ($P < 0,05$; Newman-Keuls). **Fonte:** autoria própria.

A análise da dosagem do IFN- γ não mostrou diferenças estatisticamente significantes quando da análise ANOVA de duas vias para o tratamento com laser na dose de 60 J/cm². Em contrapartida, os tratamentos de laser de 20 J/cm² e 10 J/cm² mostraram diferença significativa na análise estatística Two-Way ANOVA. Para a dose de 20 J/cm² foi verificada diferença no fator tempo ($F_{3,62}= 3,289$; $P < 0,05$) mas não no fator tratamento ou interação entre eles. Dentro do período de 10 dias após o início da experimentação verificou-se diferença entre o grupo SAL e os grupos CFA e CFA+LASER ($P < 0,05$; Newman-Keuls). Para a dose de 10 J/cm² observou-se diferenças entre os diferentes grupos no fator tratamento ($F_{3,55}= 3,099$; $P < 0,05$) mas não foi visualizado interação entre eles. O grupo SAL+LASER foi diferente dos demais grupos no período de 3 dias ($P < 0,05$; Newman-Keuls - Figura 17).

Figura 17: Gráficos de dosagem da citocina IFN-g (pg/mL). Gráficos correspondentes às leituras de INF-g para os tratamentos das doses de laser de 10 J/cm², 20 J/cm² e 60 J/cm². (*) o grupo foi diferente dos demais dentro do mesmo período ($P < 0,05$; Newman-Keuls). (a) o respectivo grupo foi diferente de CFA e CFA+LASER ($P < 0,05$; Newman-Keuls). Fonte: **autoria própria**.

Análise de Citocinas Anti-inflamatórias

A análise estatística, ANOVA de duas vias, para a citocina IL-4, mostrou diferença no fator tratamento ($F_{3,57}= 5,083$; $P < 0,05$) quando da aplicação da dose de 60 J/cm². O grupo SAL+LASER foi diferentes dos demais grupos no período de 3 dias após a indução da inflamação e LLLT ou não ($P < 0,05$; Newman-Keuls). E para a dose de 20 J/cm² foi verificada diferença nos fatores tempo ($F_{3,57}= 2,989$; $P < 0,05$) e tratamento ($F_{3,57}= 3,484$; $P < 0,05$) mas não se verificou interação entre os fatores. Enquanto que para a dose de 10 J/cm² foi mostrada diferença entre no fator tratamento ($F_{3,55}= 3,717$; $P < 0,05$). O grupo SAL foi diferente dos grupos CFA, SAL+LASER e CFA+LASER no período de 10 dias de experimentação ($P < 0,05$; Newman-Keuls - Figura 18).

Figura 18: Gráficos de dosagem da citocina IL-4 (pg/mL). Gráficos correspondentes às leituras de IL-4 para os tratamentos das doses de laser de 10 J/cm², 20 J/cm² e 60 J/cm². (*) o grupo foi diferente dos demais dentro do respectivo período ($P < 0,05$; Newman-Keuls). (a) o respectivo grupo foi diferente dele mesmo quando comparado aos demais períodos de experimentação ($P < 0,05$; Newman-Keuls). (b) o grupo foi diferente de CFA e CFA+LASER ($P < 0,05$; Newman-Keuls). **Fonte:** autoria própria.

A citocina IL-10 não mostrou diferença estatisticamente significativa quando comparado os grupos com ou sem inflamação analisados ao longo do período de 10 dias. (Figura 19)

Figura 19: Gráficos de dosagem da citocina IL-10 (pg/mL). Gráficos correspondentes às leituras de IL-10 para os tratamentos das doses de laser de 10 J/cm², 20 J/cm² e 60 J/cm². **Fonte:** autoria própria.

A análise estatística TWO-WAY ANOVA para a interleucina IL-13 mostrou, para o tratamento com dose de 60 J/cm², diferença no fator tratamento ($F_{3,57} = 5,071$; $P < 0,05$). No período de 3 dias, o grupo SAL+LASER foi diferentes dos demais grupos, assim como, dentro do próprio grupo houve diferença entre o período de 3 dias quando comparado a 1 dia ($P < 0,05$; Newman-Keuls – Figura 20). Para a dose de 20 J/cm², diferenças foram encontradas entre os fatores tempo ($F_{3,57} = 4,783$; $P < 0,05$), tratamento ($F_{3,57} = 4,334$, $P < 0,05$) e também interação entre tempo e tratamento ($F_{9,57} = 3,168$; $P < 0,05$). O grupo SAL+LASER evidenciou diferença significativa ($P < 0,001$, Newman-Keuls) quando comparado aos demais grupos no período de 10 dias de experimentação. E dentro do grupo SAL+LASER foi verificado diferença na comparação entre o

período de 10 dias e 1, 3 e 7 dias ($P < 0,05$; Newman-Keuls - Figura 20). Para a dose de 10 J/cm^2 não foram vistas diferenças estatisticamente significantes (Figura 20).

Figura 20: Gráficos de dosagem da citocina IL-13 (pg/mL). Gráficos correspondentes às leituras de IL-13 para os tratamentos das doses de laser de 10 J/cm^2 , 20 J/cm^2 e 60 J/cm^2 . (*) o grupo é diferente dos demais dentro do período ($P < 0,05$; Newman-Keuls). (b) o respectivo grupo foi diferente do grupo CFA e CFA+LASER dentro do mesmo período ($P < 0,05$; Newman-Keuls). **Fonte:** autoria própria.

4. Análise Histológica

Para realização da análise histológica foram dissecadas ATMs de ratos que receberam a injeção CFA ou SAL intraarticular e aplicação ou não de LLLT. Verificou-se num primeiro momento, como parâmetro anatômico para confirmação da inflamação, o aspecto das peças. Observou-se presença de edema e espessamento da cápsula articular nas amostras obtidas de ratos que receberam CFA intraarticular (Figura 21).

Figura 21: Aspectos anatômico de peças de ATM removidas de animais que receberam SAL (à esquerda) ou CFA (à direita). Fotografia retirada de amostras de ratos com máquina fotográfica Cannon com zoom automático. **Fonte:** autoria própria.

Da análise histológica com a técnica de H&E, foi considerado o infiltrado inflamatório presente na cápsula articular, o qual era composto por células polimorfonucleares. As figuras representativas do côndilo mandibular foram tiradas com aumento de 40x, sendo assim possível identificar alguns tipos celulares de interesse com clareza. Os pontos analisados foram três, região anterior, média e posterior, foi tomada a quantidade total de células encontradas nessas regiões e foi realizada a média aritmética para realização de análise estatística. As fotomicrografias colocadas em destaque no painel são representativas podendo ser das regiões apontadas (Figuras 24, 26 e 28). Em acréscimo, a região dos ligamentos anteriores e retrodiscais não foram incluídos na análise, uma vez que o material utilizado para as demais análises foram restritos a cápsula articular, evitando assim uma superestimativa da quantidade de infiltrado inflamatório.

Figura 22: Fotomicrografia de ATM com aumento de 5x. Em destaque, o aspecto anatômico de ATM de rato em corte sagital com visualização da região anterior, média e posterior do disco e cápsula articular. **Fonte:** autoria própria.

O tratamento de laser de baixa intensidade nas diferentes doses utilizadas neste trabalho mostrou redução do número de células polimorfonucleares induzidas pela administração de CFA intraarticular (Figuras 24, 26 e 28).

Os diferentes grupos, CFA, SAL, CFA+LASER e SAL+LASER, que receberam a dose de laser de 60 J/cm^2 , foram analisados através do teste estatístico ANOVA de duas vias que apontou diferença significativa no fator tratamento ($F_{4,78} = 17,80$; $P < 0,001$), porém não foi verificado interação entre os fatores analisados tempo e tratamento. O grupo CFA foi diferentes dos demais grupos ($P < 0,05$; Newman-Keuls - Figura 23).

A análise histológica para amostras obtidas de animais tratados com SAL ou CFA nas ATMs e submetidos ou não a laser de baixa intensidade na dose de 20 J/cm^2 mostram diferença entre a

infiltração de espécies inflamatórias em tecido articular, mais especificamente região de cápsula articular (Figura 26).

A análise estatística do número total de células polimorfonucleares mostrou diferença significativa entre os tratamentos ($F_{4,62} = 13,078$; $P < 0,001$), mas não houve interação entre os fatores analisados, tempo e tratamento. A plicação teste *post hoc* de Newman-Keuls revelou diferença significativa ($P < 0,05$) entre o grupo CFA quando comparado com os grupos SAL, CFA+LLLT e SAL+LLLT ($P < 0,05$; Newman-Keuls - Figura 25).

A análise histológica para amostras obtidas de animais tratados com SAL ou CFA nas ATMs e submetidos ou não a LLLT na dose de $10\text{J}/\text{cm}^2$ mostram alteração na infiltração de espécies polimorfonucleares típicas da inflamação em tecido articular, mais especificamente região de cápsula articular (Figura 28).

Os diferentes grupos, CFA, SAL, CFA+LASER e SAL+LASER, foram analisados através do teste estatístico ANOVA de duas vias observou diferença significativa no fator tratamento ($F_{4,62} = 4,14$; $P < 0,05$), porém não foi verificado interação entre os fatores analisados tempo e tratamento. O teste *post hoc* de Newman-Keuls apontou diferença significativa ao décimo dia ($P < 0,05$) entre o grupo CFA e os demais grupos (Figura 27).

Figura 23: Gráfico de células inflamatórias. Análise de lâminas histológicas coradas em H&E e analisadas para quantificação de células polimorfonucleares em condilos mandibulares de ratos tratados com CFA ou SAL e submetidos ou não a LLLT com dose de $60\text{J}/\text{cm}^2$. (a) quando o grupo CFA+LLLT foi diferente dos demais grupos ($P < 0,05$; Newman-Keuls). (*) quando o grupo é diferente de SAL e SAL+LASER ($P < 0,05$; Newman-Keuls). Fonte: **autoria própria**.

Figura 24: Fotomicrografias representativas de articulação temporomandibular com coloração de HE com aumento de 40x. Região de cabeça do côndilo, especificamente, cápsula articular, evidenciando a presença de infiltrado inflamatório. Representação de grupos tratados com ou sem laser de baixa intensidade na dose de 60 J/cm^2 .

Figura 25: Gráfico de células inflamatórias. Análise de lâminas histológicas coradas em H&E e analisadas para quantificação de células polimorfonucleares em côndilos mandibulares de ratos tratados com CFA ou SAL e submetidos ou não a LLLT com dose de 20 J/cm^2 . (a) quando o grupo CFA foi diferente de SAL e SAL+LLLT ($P < 0,05$; Newman-Keuls). (*) quando o grupo CFA é diferente dos demais grupos ($P < 0,05$; Newman-Keuls). **Fonte:** autoria própria.

Figura 26: Fotomicrografias representativas de articulação temporomandibular com coloração de HE com aumento de 40x. Região de cabeça do côndilo, especificamente, cápsula articular, evidenciando a presença de infiltrado inflamatório (setas). Representação de grupos tratados com ou sem laser de baixa intensidade na dose de 20 J/cm^2 . **Fonte:** autoria própria.

Figura 27: Gráfico de células inflamatórias. Análise de lâminas histológicas coradas em H&E e analisadas para quantificação de células polimorfonucleares em côndilos mandibulares de ratos tratados com CFA ou SAL e submetidos ou não a LLLT de baixa intensidade com dose de 10 J/cm^2 . (a) quando o grupo CFA foi diferente de SAL e SAL+LLLT ($P < 0,05$; Newman-Keuls). (*) quando o grupo CFA é diferente dos demais grupos ($P < 0,05$; Newman-Keuls). **Fonte:** autoria própria.

Figura 28: Fotomicrografias representativas de articulação temporomandibular com coloração de HE com aumento de 40x. Região de cabeça do côndilo, especificamente, cápsula articular, evidenciando a presença de infiltrado inflamatório (setas). Representação de grupos tratados com laser de baixa intensidade na dose de 10 J/cm^2 . **Fonte:** autoria própria.

5. Imunohistoquímica para marcação de MMPs no gânglio trigeminal

A análise de lâminas com marcação imunohistoquímica para MMP-2, MMP-9, proteína fibrilar glial e Iba-1 mostrou maior expressão das gelatinases em células neuronais (neurônios). Os resultados analisados pelo programa ImageJ estão descritos abaixo segundo a dose de laser aplicada (10 J/cm^2 , 20 J/cm^2 , 60 J/cm^2).

A fluorescência quantificada pelo programa ImageJ para as lâminas marcadas para MMP-2 em amostras de ratos tratados com LLLT com dose de 10 J/cm^2 mostrou diferença quando da análise de interação dos fatores tratamento e período ($F_{3,32} = 2,583$; $P < 0,05$; TWO-WAY ANOVA). O teste *post hoc* Newman-Keuls evidenciou diferença significativa entre o grupo CFA, no período de 7 dias ($P < 0,05$) quando comparado com os períodos de 1, 3 e 10 dias. Ainda, no mesmo período de 7 dias,

o grupo CFA foi diferentes dos grupos SAL, SAL+LASER e CFA+LASER ($P < 0,05$; Newman-Keuls - Figura 29). A análise de variância para expressão de MMP-9 não apontou diferenças significantes na comparação dos fatores tempo e tratamento. (Figura 31)

A densidade de luminescência avaliada nas lâminas contendo amostras de ratos tratados com LLLT com dose de 20 J/cm^2 , mostrou diferença significativa para MMP-2, nos fatores tratamento ($F_{3,31} = 3,634$; $P < 0,05$; TWO-WAY ANOVA), período ($F_{3,31} = 12,623$; $P < 0,001$; TWO-WAY ANOVA), assim como interação entre eles ($F_{9,31} = 7,411$; $P < 0,001$; TWO-WAY ANOVA). O teste de Newman-Keuls apontou diferença do grupo SAL quando comparado o período de 7 dias aos períodos de 1, 3 e 10 dias, dentro do mesmo grupo, bem como foi verificada diferença significativa quando comparado com os grupos CFA e SAL+LASER ($P < 0,05$; Newman-Keuls). Em adição, o grupo CFA+LASER quando comparado separadamente os períodos de 1 e 3 dias com os períodos de 7 e 10 ($P < 0,05$; Newman-Keuls). Além do mais, o grupo CFA+LASER foi diferente dos demais tratamentos no período de 1 dia ($P < 0,05$; Newman-Keuls), e foi diferente apenas de SAL e CFA no período de 3 e 7 dias. Com relação ao grupo SAL+LASER observou-se diferença significativa ($P < 0,05$; Newman-Keuls) quando comparados com os grupos SAL e CFA nos períodos de 3 e 7 dias. (Figura 33).

A análise de variância (TWO-WAY ANOVA) da marcação da MMP-9 apontou diferenças entre o fator tratamento ($F_{3,31} = 6,012$; $P < 0,05$), tempo ($F_{3,31} = 3,803$; $P < 0,05$), e, ainda, interação entre tempo e tratamento ($F_{9,31} = 2,608$; $P < 0,05$). Dentro do grupo SAL+LASER foi revelada diferença entre o período de 7 dias quando comparado aos períodos de 1, 3 e 10 dias ($P < 0,05$; Newman-Keuls). Para o grupo CFA+LASER, o *post hoc* teste de Newman-Keuls revelou diferença no período de 3 dias quando comparado com os períodos de 1, 7 e 10 dias ($P < 0,05$). Os grupos SAL e CFA foram diferentes de SAL+LASER e CFA+LASER no período de 3 dias ($P < 0,05$; Newman-Keuls). E apenas o grupo SAL+LASER foi diferente de SAL e CFA+LASER no período de 7 dias ($P < 0,05$; Newman-Keuls - Figura 35).

Considerando o tratamento com dose de LLLT na dose de 60 J/cm^2 , a análise de variância para MMP-2 destacou a diferença no tratamento ($F_{3,31} = 6,590$; $P < 0,05$), tempo ($F_{3,31} = 13,507$; $P < 0,001$) e também interação os fatores tempo e tratamento ($F_{9,31} = 3,377$; $P < 0,05$). O teste *post hoc* de Newman-Keuls evidenciou que o grupo SAL no período de 7 dias foi diferente quando comparado ao mesmo tratamento nos períodos de 1, 3 e 10 dias ($P < 0,05$), assim como o grupo CFA ($P < 0,05$). No período de 7 dias o grupo CFA, bem como o grupo SAL, foram diferentes dos grupos CFA+LASER, SAL+LASER ($P < 0,05$) (Figura 37). Para marcação para MMP-9, a análise estatística TWO-WAY ANOVA, não apontou diferenças com relação ao tempo, tratamento, nem interação entre tempo e tratamento considerando todos os grupos realizados (Figura 39).

Figura 29: Gráfico de expressão de MMP-2. Gráfico evidenciando análise comparativa entre os grupos SAL, CFA, SAL+LASER e CFA+LASER após aplicação de LLLT 10 J/cm^2 . (#) quando o grupo foi diferente dos tratamentos SAL+LASER e CFA+LASER ($P < 0,05$; Newman-Keuls). **Fonte:** autoria própria.

Figura 30: Fotomicrografias representativas do grupo 10 J/cm² marcados para MMP-2. Na imagem são apresentadas fotos de lâminas imunofluorescentes marcadas para MMP-2 e GFAP ou Iba-1. Na última linha de imagens, estão apresentadas imagens representativas de cortes corados em H&E mostrando a região do gânglio trigeminal contendo corpos celulares. Imagens com aumento de 40x. **Fonte:** autoria própria.

Figura 31: Gráfico de expressão de MMP-9. Gráfico evidenciando análise comparativa entre os grupos SAL, CFA, SAL+LASER e CFA+LASER após aplicação de LLLT 10 J/cm^2 . (#) quando o grupo foi diferente dos tratamentos SAL+LASER e CFA+LASER ($P < 0,05$; Newman-Keuls). **Fonte:** autoria própria.

Figura 32: Fotomicrografias representativas do grupo 10 J/cm² marcados para MMP-9. Na imagem são apresentadas fotos de lâminas imunofluorescentes marcadas para MMP-2 e GFAP ou Iba-1. Na última linha de imagens, estão apresentadas imagens representativas de cortes corados em H&E mostrando a região do gânglio trigeminal contendo corpos celulares. Imagens com aumento de 40x. Fonte: autoria própria.

Figura 33: Gráfico de expressão de MMP-2. Gráfico evidenciando análise comparativa entre os grupos SAL, CFA, SAL+LASER e CFA+LASER após aplicação de LLLT 20 J/cm^2 . (*) o grupo foi diferente dos demais dentro do mesmo período ($P < 0,05$; Newman-Keuls). (a) o grupo no período de 7 dias foi diferente do mesmo grupo quando comparado aos demais períodos ($P < 0,05$; Newman-Keuls). **Fonte:** autoria própria.

Figura 34: Fotomicrografias representativas do grupo 20 J/cm² marcados para MMP-2. Na imagem são apresentadas fotos de lâminas imunofluorescentes marcadas para MMP-2 e GFAP ou Iba-1. Na última linha de imagens, estão apresentadas imagens representativas de cortes corados em H&E mostrando a região do gânglio trigeminal contendo corpos celulares. Imagens com aumento de 40x. Fonte: autoria própria.

Figura 35: Gráfico de expressão de MMP-9. Gráfico evidenciando análise comparativa entre os grupos SAL, CFA, SAL+LASER e CFA+LASER após aplicação de LLLT 20J/cm². (*) o grupo foi diferente dos demais dentro do mesmo período ($P < 0,05$; Newman-Keuls). Em (#) o respectivo grupo foi diferente dos grupos SAL+LASER e CFA+LASER ($P < 0,05$; Newman-Keuls). Em (b) o grupo no período de 7 dias foi diferente dos grupos SAL e CFA+LASER ($P < 0,05$; Newman-Keuls). **Fonte:** autoria própria.

Figura 36: Fotomicrografias representativas do grupo 20 J/cm² marcados para MMP-9. Na imagem são apresentadas fotos de lâminas imunofluorescentes marcadas para MMP-2 e GFAP ou Iba-1. Na última linha de imagens, estão apresentadas imagens representativas de cortes corados em H&E mostrando a região do gânglio trigeminal contendo corpos celulares. Imagens com aumento de 40x. **Fonte:** autoria própria

Figura 37: Gráfico de expressão de MMP-2. Gráfico evidenciando análise comparativa entre os grupos SAL, CFA, SAL+LASER e CFA+LASER após aplicação de LLLT 60J/cm². (*) o grupo foi diferente dos demais dentro do mesmo período (P < 0,05; Newman-Keuls). (#) o respectivo grupo foi diferente dos grupos SAL+LASER e CFA+LASER (P < 0,05; Newman-Keuls). (a) o respectivo grupo no período de 7 dias foi diferente dos grupos SAL+LASER e CFA+LASER (P < 0,05; Newman-Keuls). **Fonte:** autoria própria.

Figura 38: Fotomicrografias representativas do grupo 60 J/cm² marcados para MMP-2. Na imagem são apresentadas fotos de lâminas imunofluorescentes marcadas para MMP-2 e GFAP ou Iba-1. Na última linha de imagens, estão apresentadas imagens representativas de cortes corados em H&E mostrando a região do gânglio trigeminal contendo corpos celulares. Imagens com aumento de 40x. **Fonte:** autoria própria

Figura 39: Gráfico de expressão de MMP-2. Gráfico evidenciando análise comparativa entre os grupos SAL, CFA, SAL+LASER e CFA+LASER após aplicação de LLLT 60 J/cm^2 . **Fonte:** autoria própria.

Figura 40: Fotomicrografias representativas do grupo 60 J/cm² marcados para MMP-9. Na imagem são apresentadas fotos de lâminas imunofluorescentes marcadas para MMP-9 e GFAP ou Iba-1. Na última linha de imagens, estão apresentadas imagens representativas de cortes corados em H&E mostrando a região do gânglio trigeminal contendo corpos celulares. Imagens com aumento de 40x. **Fonte:** autoria própria.

Discussão

Os resultados apresentados neste trabalho mostram que a LLLT, com aplicação das doses de 10 J/cm², 20 J/cm² e 60 J/cm², reduziram a atividade oxidativa presente nas amostras de líquido sinovial dos grupos CFA+LASER analisadas pelo teste de atividade de MPO, o qual verifica os radicais livres produzidos durante a resposta inflamatória. Verificou-se através do teste de atividade de MPO a redução de espécies reativas de oxigênio (ROS) quando da aplicação de LLLT em grupos nos quais foi induzida a inflamação da ATM (CFA+LLLT) quando comparado ao grupo que apenas recebeu CFA intraarticular. Ainda, o grupo CFA+LLLT não apresentou diferenças quando comparado aos grupos SAL e SAL+LLLT.

Os processos inflamatórios, como na DTM, podem se desenvolver a partir da compressão de tecidos que, por ação da hipóxia gerada leva a produção de mediadores inflamatórios dentre eles citocinas e ROS, que causam a sensibilização de terminações nervosas e posteriormente a destruição tecidual (CAIRNS, 2010). Evidências prévias mostraram que a LLLT com laser de HeNe aumentou a produção de ATP e consumo de oxigênio (KARU e cols., 1995). TAFUR & MILLS (2008) destacam que o organismo é mantido em estado redox, ou seja, existe um balanço entre a produção de ROS e sua eliminação. Aponta-se que a ação do laser poderia ocorrer através desse sistema minimizando a atividade oxidativa e produção das ROS. Estudos de EELLS e cols. (2003, 2004) mostram que a estimulação com laser de baixa intensidade (670nm) podem modular moléculas conhecidas por inibir diretamente a atividade do citocromo C oxidase. Em situações pro-oxidantes, como diabetes e inflamação crônica, ocorre oxidação do citocromo C, aumentando a sensibilização mitocondrial pelo laser, sendo assim, a laserterapia promoveria aumento do metabolismo celular resultando na proliferação celular.

Dentro desta perspectiva, estudo de RIZZI e cols. (2006) mostrou que a LLLT (5 J/cm²) reduziu a resposta inflamatória via bloqueio da liberação de ROS em modelo de lesão do músculo gastrocnêmio em ratos. Ainda, AVNI e cols (2005) em estudo para evidenciar a ação da LLLT em recuperação tecidual de músculo lesionado por isquemia-reperfusão, observou melhora do reparo tecidual além de redução de creatina fosfoquinase e de fosfatase ácida após LLLT. Ainda, este estudo mostrou aumento da expressão da proteína hsp-70i, conhecida por sua atuação citoprotetora, induzida pela LLLT (AVNI e cols., 2005). SILVEIRA e cols. (2013) mostrou em modelo de injúria muscular, a aceleração da regeneração muscular e redução da produção de superóxidos promovidos pela laserterapia.

Neste trabalho foi verificada a redução da infiltração de células tipicamente inflamatórias, destacando-se a presença de células polimorfonucleares. Com relação aos resultados obtidos da pesquisa de células polimorfonucleares em lâminas coradas com H&E foi evidenciado diferença no tratamento para animais com indução da inflamação das ATMs (CFA) quando comparado aos grupos Controle, SAL, SAL+LLLT e CFA+LLLT. Corroborando este achado, trabalho de CARVALHO e cols. (2011) mostrou redução do infiltrado inflamatório em ATMs de ratos com inflamação induzida por carragenina após aplicação de LLLT (225 J/cm^2 ou 120 J/cm^2). Em adição, MORAIS e cols. (2010), estudando a formação de edema em modelo de inflamação articular com zimosan, verificaram que a LLLT no comprimento de onda 685 nm e 830 nm e dose de $2,5 \text{ J/cm}^2$ apresentaram resultados similares ao tratamento com dexametasona, um antiinflamatório esteroidal. Ainda, ALMEIDA e cols. (2012) evidenciaram que a aplicação de laser de baixa intensidade em diferentes doses (1, 3 ou 9 J) reduziu a expressão de biomarcadores inflamatórios, TNF- α e de COX-1 e COX-2. A redução destes marcadores da inflamação acarretou menor migração de neutrófilos e macrófagos, e menor liberação de ROS (ALMEIDA e cols., 2012).

Inversamente, no presente estudo, os resultados obtidos a partir de amostras submetidas a LLLT com dose de 60 J/cm^2 não reduziu o infiltrado de células polimorfonucleares em todos os períodos analisados, ainda foi verificado o aumento dessas células na cápsula articular nos períodos de 3, 7 e 10 dias. Como mostrado em trabalho de REDDY (2004), a LLLT pode não possuir efeito terapêutico, destacando protocolos muito diferenciados entre si além do questionamento sobre o real mecanismo de ação do laser, dosimetria e a variedade de energia. Além disso, POGREL e cols. (1997) mostraram efeito contrário ao esperado em estudo *in vitro* de cultura de células com fibroblastos e queratinócitos. Em particular, POGREL e cols. (1997) não evidenciaram nem a adesão, migração celular ou proliferação celular na cultura de fibroblastos e queratinócitos quando da estimulação com LLLT na dose de 5- 10 mW/10-120 s. Como destacado em revisão de REDDY (2004), a LLLT tem algumas divergências em seu efeito terapêutico em doses com altas frequências. Dentro dessa perspectiva, a dose de 60 J/cm^2 (40 mW/60 s), utilizada no presente trabalho, mostrou redução do efeito antiinflamatório devido ao aumento na migração de células polimorfonucleares responsáveis pela manutenção da inflamação.

Sabe-se que a produção de agentes inflamatórios, como citocinas e MMPs, é primordial para a quimiotaxia de infiltrado inflamatório, e que a redução dessa infiltração nos sugere menor expressão de inflamação local (ISHIMARU e cols., 2000; GUERRA e cols., 2012; McINNES e cols., 2015; BRENNAN & McINNES, 2008).

Considerando a expressão de citocinas no líquido sinovial coletado da membrana sinovial de ratos tratados ou não com LLLT, nossos resultados mostram que a LLLT é eficaz quando da análise

de algumas citocinas, principalmente aquelas relacionadas à resposta inflamatória associada à DTM. A LLLT com dose de 10 J/cm^2 inibiu o aumento da expressão das citocinas pró-inflamatórias IL-2 e INF- γ no grupo de CFA+LASER, no entanto, para o grupo controle (SAL+LASER) a aplicação de LLLT promoveu aumento da expressão dessas citocinas evidenciando exacerbação do quadro inflamatório.

As doses de 10 J/cm^2 e 60 J/cm^2 alteraram a expressão das citocinas pró-inflamatória GM-CSF e IL-12p70 em grupos controle (SAL+LASER) evidenciando o papel dual da aplicação do laser, com aumento da resposta inflamatória em líquido sinovial. Inversamente, as citocinas conhecidamente promotoras da instalação da resposta inflamatória, IL-1 α , IL-1 β , a LLLT bloqueou o aumento da expressão dessas citocinas revelando um papel protetor. Para TNF- α a maior expressão verificada ocorreu ao 7º dia, no entanto, a LLLT aumentou a expressão dessa citocina, principalmente, sob ação do laser com doses de 20 J/cm^2 e 60 J/cm^2 .

ALBERTINI e cols. (2008) em seu trabalho sobre ação do laser na expressão de RNA para as citocinas IL-6, TNF- α e IL-1 β com modelo de inflamação com carragenina no músculo subplantar mostrou que a LLLT na dose de $7,5 \text{ J/cm}^2$ reduziu a expressão dos RNAs dessas citocinas. Resultado semelhante foi observado no trabalho de ALVES e cols. (2013), no qual a expressão de IL-6, TNF- α e IL-1 β foi reduzido após a aplicação de laser com dose de $142,4 \text{ J/cm}^2$ (50 mW) em modelo de inflamação articular com papaína. Estudo de CARVALHO e cols. (2015) mostrou que a administração intraplantar de G-CSF causou hiperalgesia mecânica e aumento na expressão de TNF- α e IL-1 β e reduziu a expressão de IL-10 nos tecidos plantares. Logo, é sugerida a participação da citocina G-CSF, assim como das citocinas TNF- α e IL-1 β , na modulação de vias nociceptivas, primeiramente, na hipersensibilização de nociceptores.

Para análise das citocinas anti-inflamatórias, IL-13 e IL-4 mostraram diferença significativa nos grupos tratados com LLLT nas doses de 20 J/cm^2 e 60 J/cm^2 . Nos grupos controle, SAL e SAL+LASER, houve maior expressão da citocina IL-4 ao longo do período analisado. Ainda, a dose de 60 J/cm^2 promoveu aumento da expressão de IL-13 no grupo CFA+LASER, evidenciando o efeito protetor promovido pela LLLT. Para a dose de 10 J/cm^2 a IL-4 e IL-13 não mostrou diferença no tratamento com laser de baixa intensidade. VERNAL e cols. (2008) mostraram que pacientes saudáveis apresentam níveis elevados de IL-10 (citocina anti-inflamatória), enquanto pacientes portadores de osteoartrite apresentam IL-1 β , IL-2, IL-12p35, IL-12p40, IL-17, TNF- α , TNF- β e INF- γ (citocinas pró-inflamatórias relacionadas ao início e manutenção da resposta inflamatória).

MOALEM e cols. (2006) enfatiza o importante papel da resposta imune inflamatória para o desenvolvimento e manutenção da dor, bem como o envolvimento de citocinas com a estimulação da

expressão de citocinas correlacionadas e mediadores teciduais. De fato, mediadores teciduais, como as MMPs, são estímulos positivos para a expressão de citocinas, as quais por sua vez promovem a expressão de quimiocinas e recrutam células de defesa do sistema, além de sensibilizar terminações nervosas (MOALEM e cols., 2006; SHUBAYEV & MAYERS, 2002).

CHOI e cols. (2015) observaram a expressão de IL-1 β e Iba-1 na micróglia na região de medula espinhal e alodinia mecânica bilateral em ratos que receberam administração de carragenina na pata traseira unilateral, evidenciando o papel das citocinas na ativação de estruturas centrais. Na mesma linha de pensamento, JALAL e cols. (2012) descrevem que as MMP-2, MMP-9 e TNF- α estão envolvidas com a neuroinflamação advinda da hipóxia da barreira hematoencefálica induzida por hipertensão, levando a perda da proteína mielínica básica. Desta forma, o bloqueio desses mediadores inflamatórios pode reduzir a neuroinflamação. Ainda, na dor neuropática induzida por modelo Walleriano (constricção do nervo) há o aumento da expressão de TNF- α mediado por fatores teciduais, em específico, por MMP-2 e MMP-9, bem como a administração de inibidores de MMP é capaz de reverter a perda de mielina básica em células de Schwann (SHUBAYEV & MAYERS, 2002). No mais, GROEF e cols. (2015) evidenciaram em camundongos knockout para MMP-2 menor perda celular no gânglio causado pela metaloproteinase. Ainda, administração intravitreal de NMDA induziu a expressão de MMP-2 por células gliais de Müller (célula suporte) acompanhada de reatividade normal da glia, além de reduzir os níveis de TNF, sugerindo um papel fundamental da MMP-2 pra estimulação de respostas inflamatórias e sua participação em doenças que acometem o sistema nervoso central (GROEF e cols., 2015).

É descrito que as MMPs são expressas em tecidos inflamados e promovem feedback positivo para expressão de mediadores inflamatórios e recrutamento de células de defesa (PARKS e cols., 2004). Os resultados para expressão de MMP-2 e MMP-9, quando do tratamento com LLLT, foram diferentes da expressão das mesmas em ratos que receberam CFA intraarticular sem LLLT ao longo do tempo através de análise por zimografia convencional. É evidenciado o envolvimento das MMPs na inflamação intraarticular, uma vez que essas enzimas clivam moléculas da matriz extracelular (CAUWE & OPDENAKKER, 2010). Nossos achados mostraram que as doses 10 J/cm² e 20 J/cm², reduzem significativamente a expressão de MMP-2, em seus diferentes pesos moleculares, e de MMP-9 em amostras de lavado de líquido sinovial das ATMs. Estes resultados corroboram estudo de ALVES e cols. (2013) que apontou redução das mesmas gelatinases (MMP-2 e MMP-9) em modelo de inflamação da articulação do joelho com papaína em ratos submetidos a LLLT com dose de 1,8 W/cm² e 3,5 W/cm². O lavado coletado dos joelhos dos ratos tratados mostraram que a dose de 3,5 W/cm² foi mais eficaz na redução da expressão de MMP-2 e MMP-9 e no reparo tecidual (ALVES e cols., 2013). Corroborando estes achados, GUERRA e cols. (2012) verificaram cicatrização do

tendão calcâneo com melhor arranjo estrutural após a LLLT. Em particular, observou-se durante a recuperação de ratos tenotomizados (rompimento do tendão calcâneo) submetidos à LLLT (4 J/cm²) que havia maior expressão de MMP-2 com melhor arranjo arquitetônico das fibras nervosas, com menor área de fibrose (GUERRA e cols., 2012).

A inflamação ocorrida localmente na ATM aumenta a expressão não apenas de MMPs, mas também, de outras substâncias inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF) e as interleucinas. Estas, como apresentado na literatura, promovem a modulação do impulso nervoso nociceptivo, modificando a percepção da dor crônica de indivíduos acometidos pela DTM. PINTO e cols. (2010) mostraram, em modelo de artrite induzida pelo antígeno soro de albina bovina metilada (mBSA), o papel hipernociceptivo e intermediador da IL-17 durante o processo artrítico de camundongos. No mais, destaca-se o papel de recrutamento dessa interleucina para células inflamatórias de defesa incluindo neutrófilos e que a administração de inibidor de IL-17 ajudou a diminuir o recrutamento de células inflamatórias (PINTO e cols., 2010). BLUM e cols. (2014) mostraram, através de modelo de inflamação sistêmica com administração de LPS intraperitoneal, o aumento das junções GAP e proliferação anormal das CSGs assim como redução do limiar nociceptivo avaliado pelo teste de filamento de von Frey.

REN & DUBNER (2010) descrevem a interação entre células do sistema imune e CSGs com neurônios, sendo esta interação importante para a transição de dor aguda em crônica. De fato, as células do sistema imune e mediadores inflamatórios sensibilizam terminações nervosas e modulam a excitabilidade das vias de percepção a dor (REN & DUBNER, 2010; LI TIAN e cols., 2007). LI TIAN e cols. (2007) relataram que as metaloproteinases desenvolvem papel fundamental nas alterações do microambiente do sistema nervoso central. Nestes estudos, os autores mostraram que as MMPs participam do densenvolvimento axonal e do prolongamento dendrítico, quando comparados camundongos knckout para MMP-2 e camundongos selvagens (LI TIAN e cols., 2007).

Em nosso estudo, amostras de gânglio cortadas e tratadas para imunohistoquímica para marcação de MMP-2 e MMP-9 mostram aumento na expressão das MMPs no gânglio trigeminal, assim como observado na zimografia convencional de amostras de líquido sinovial. Ratos submetidos à inflamação persistente das ATMs e sem tratamento com LLLT (CFA) mostraram maior expressão das MMPs comparados com grupos tratados com LLLT (CFA+LASER e SAL+LASER). Esta marcação foi verificada em todo TG, mas em especial em neurônios e em regiões co-localizadas com GFAP, um reconhecido marcador da atividade de CSGs. A marcação GFAP em células do TG ocorre ao redor de neurônios mostrando a atividade e a ligação ocorrida entre as células (BAYERS e cols., 2004). Os achados do presente trabalho corroboram estudo anterior de DONEGAN e cols (2013), no qual a constrição de nervo infra-orbital induziu a

proliferação das CSGs no TG, com maior expressão de GFAP. Ainda, LUKÁCS e cols. (2015) mostraram que, após administração de CFA na dura-máter, observou-se aumento da reatividade de neurônios e CSGs, sugerindo possível interação entre essas células. Por outro lado, LIN e cols. (2007) evidenciaram que inflamação periférica induzida pelo CFA apenas produziu ativação microglial periférica sem produzir alterações morfológicas. Em contraste, INOUE & TSUDA (2009) descreveram a importância da micróglia para modulação da dor neuropática, desde que maior número alterações morfológicas foram encontradas em modelo de injúria de nervo, ou seja, em casos de dor neuropática (INOUE & TSUDA, 2009).

Estudo prévio de BEM-DOV e cols., (1998) mostra que a irradiação com laser de baixa intensidade (4,5 mW – laser de HeNe) em cultura de células satélites aumentou a proliferação celular e de proteínas regulatórias do ciclo celular quando aplicada por três segundos. Assim como os resultados obtidos neste trabalho, a LLLT de HeNe com dose de 20 J/cm^2 em modelo de doença degenerativa com administração de lipossacarídeos (LPS) reduziu a expressão de pró-inflamatórios (NO e TNF- α) e melhorou a função fagocítica microglial (SONG e cols., 2012). Trabalho de KHUMAN e cols. (2012) mostrou que a aplicação de LLLT com dose de 60 J/cm^2 em modelo de injúria cerebral traumática experimental inibiu a microgliolise após 48 horas e melhorou o déficit cognitivo após 7 dias, avaliado pelo teste de labirinto de água de Morris.

No presente trabalho a LLLT reduziu promoveu respostas ambíguas na expressão de citocinas pró-inflamatórias, corroborando com nossos resultados estudo de ALVES e cols. (2013) mostraram que a aplicação de laser com dose de $142,4 \text{ J/cm}^2$ em modelo de inflamação articular com papaína, a terapia com milivoltagem de 50mW reduziu a expressão de IL-1 β e IL-6 e TNF- α diferente da terapia de 100mW, ambas na mesma potência. Dentro da mesma linha de investigação, GIGO-BENATO e cols. (2010) analisaram o efeito de diferentes doses de laser (10 J/cm^2 , 60 J/cm^2 e 120 J/cm^2) no reparo de tecido nervoso e atividade de MMP após injúria de nervo ciático, e, assim como o presente trabalho, mostraram que as doses baixa, 10 J/cm^2 , e moderada, 60 J/cm^2 , melhoraram o processo de reparo se comparado a dose de 120 J/cm^2 . De fato, o tratamento com laser é conhecido por apresentar resposta bifásica, dentre as quais as doses mais baixas apresentam melhores efeitos na estimulação e reparo tecidual (HUANG e cols, 2009). No mais, REDDY (2004) relatam que existe uma larga faixa de densidades de energia utilizadas em estudos e doses compreendidas entre $0.1 - 10 \text{ J/cm}^2$ estão entre as mais aceitas por seu efeito bioestimulador. CASTANO e cols. (2010), em seu experimento de modelo de inflamação com zimosan, destacaram a ação do laser e a grande abrangência das doses empregadas em estudos. A ação da terapia com luz se dá principalmente pela ativação do citocromo C oxidase presente em mitocôndrias e assim como uma frequência baixa pode não ser capaz de estimular essa molécula, doses com alta frequência podem superestimular o

metabolismo celular causando fototoxicidade (CASTANO e cols., 2010). Assim, o intenso metabolismo inflamatório em vias de sensibilidade centrais são sugeridos como gatilho para o desenvolvimento de doenças psicológicas, como a depressão (YOUNGER e cols., 2010). Bem como o inverso, quadros depressivos levariam a doenças inflamatórias como a DTM é alvo de estudo (KINDLER e cols., 2012).

Em resumo, verificamos em nossos resultados que a LLLT promove a redução da resposta inflamatória local e do infiltrado inflamatório, bem como da expressão das MMPs e de citocinas na região das ATMs. A menor expressão de MMPs no TG pode representar a redução da ativação de vias do sistema nervoso central advinda da redução da inflamação local resultante da LLLT.

Conclusão

Fundamentado em nossos achados podemos concluir deste trabalho o efeito benéfico da LLLT em casos de DTM. Especificamente concluimos:

- ❖ A LLLT em diferentes doses reduziu a expressão de mediadores inflamatórios locais em modelo de inflamação da ATM de ratos.
- ❖ A expressão de citocinas no líquido sinovial foi induzida pela inflamação promovida pela administração de CFA intra-articular foi reduzida pela LLLT.
- ❖ Em especial, a dose de 60 J/cm^2 promoveu efeito ambíguo quando da administração de SAL e LASER, promovendo aumento da expressão de citocinas pró e antiinflamatórias.
- ❖ As MMP-2 e MMP-9 também tiveram a expressão reduzida no líquido sinovial, e, em reflexo, no TG. No entanto, para as doses de 10 J/cm^2 e 20 J/cm^2 essa redução foi atenuada quando comparada a dose de 60 J/cm^2 .

Com isso podemos concluir que a LLLT possui efeito benéfico na resposta inflamatória da ATM de ratos, desde que reduziu a expressão de marcadores inflamatórios induzidos pela administração bilateral de CFA nas ATMs.

Referências Bibliográficas*

*De acordo com as normas APA

- AGUGGIA M. (2003). Neurophysiology of pain. *Neurological Sciences*, 24(2), s57-s60. DOI: 10.1007/s100720300042.
- AIRES MM. *et al.* Somesthesia in *Fisiologia*, cap. 22 figura 22.13 (2^a ed.), Guanabara Koogan, 1999.
- ALBERTINI R, VILLAVERDE AB, AIMBIRE F, BJORDAL J, BRUGNERA JR A, MITTMANN J, SILVA JR JA and COSTA M (2008) Cytokine mRNA Expression Is Decreased in the Subplantar Muscle of Rat Paw Subjected to Carrageenan-Induced Inflammation after Low-Level Laser Therapy. *Photomedicine and Laser Surgery*. 26: 1, 19–24. DOI: 10.1089/pho.2007.2119.
- ALMEIDA P, LOPES-MARTINS RAB, TOMAZONI SS, ALBUQUERQUE-PONTES GM, SANTOS LA, VANIN AA, FRIGO L, VIEIRA RP, ALBERTINI R, CARVALHO PTC & LEAL-JUNIOR ECP. (2012) Low-Level Laser Therapy and Sodium Diclofenac in Acute Inflammatory Response Induced by Skeletal Muscle Trauma: Effects in Muscle Morphology and mRNA Gene Expression of Inflammatory Markers. *Photochemistry and Photobiology*. 89 (2): 501–507. DOI: 10.1111/j.1751-1097.2012.01232.x.
- ALVES ACA, ALBERTINI R, SANTOS SA, LEAL-JUNIOR ECP, SANTANA E, SERRA AJ, SILVA-JR JÁ, CARVALHO PTC. (2013) Effect of low-level laser therapy on metalloproteinase MMP-2 and MMP-9 production and percentage of collagen types I and III in a papain cartilage injury model. *Lasers in Medical Science*. DOI 10.1007/s10103-013-1427-x.
- ALVES ACA, VIEIRA RP, LEAL-JUNIOR ECP, SANTOS SA, LIGEIRO AP, ALBERTINI R, SILVA-JUNIOR JA AND CARVALHO PTC. (2013) Effect of low-level laser therapy on the expression of inflammatory mediators and on neutrophils and macrophages in acute joint inflammation. *Arthritis Research & Therapy*, 15:R116.
- AVNI D, LEVKOVITZ S, MALTZ L, ORON U. (2005). Protection of skeletal muscles from ischemic injury: low-level laser therapy increases antioxidant activity. *Photomedicine and Laser Therapy*, 23(3), 273-277. DOI:10.1089/pho.2005.23.273.
- ANDRADE KM, RODRIGUES CA, WATANABE P, MAZZETTO MO. (2012). Styloid process elongation and calcification in subjects with TMD: clinical and radiographic aspects. *Brazilian Dental Journal*, 23(4), 443-450. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-64402012000400023>.
- AYKOL G, BASER U, MADEN I, KAZAK Z, ONAN U, TANRIKULU-KUCUK S, ADEMOGLU E, ISSEVER H AND YALCIN F. (2011). The effect of low-level laser therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment. *Journal of Periodontology*, 82(3), 481-488. DOI:10.1902/jop.2010.100195.
- BÄCK M, KETELHUTH DFJ, AGEWALL S. (2010). Matrix metalloproteinases in atherothrombosis. *Progress in cardiovascular diseases*, 52(5), 410-428. DOI: 10.1016/j.pcad.2009.12.002.

- BAYERS MR, MAEDA T, BROWN AM AND WESTENBROEK RE (2004) GFAP Immunoreactivity and Transcription in Trigeminal and Dental Tissues of Rats and Transgenic GFP/GFAP Mice. *Microscopy Research and Technique* 65:295–307. DOI 10.1002/jemt.20130.
- BERTA T, LIU T, LIU YEN-CHIN, XU ZHEN-ZHONG AND JI RU-RONG (2012) Acute morphine activates satellite glial cells and up-regulates IL-1b in dorsal root ganglia in mice via matrix metalloproteinase-9. *Molecular Pain*, 8:18. <http://www.molecularpain.com/content/8/1/18>
- BEN-DOV N, SHEFER G, IRINITCHEV A, WERNIG A, ORON U, HALEVY O. (1998) Low-energy laser irradiation affects satellite cell proliferation and differentiation in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta* 1448, 372-380.
- BLUM E, PROCACCI P, CONTE V AND HANANI M (2014) systemic inflammation alters satellite glial cell function and structure. A possible contribution to pain. *Neuroscience* 274: 209-217. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.05.029>.
- BRENNAN F & McINNES IB (2008) Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. *Journal Clinical Investigation*. 118:3537–3545. DOI:10.1172/JCI36389.
- BROOKS J & TRACEY I. (2005). REVIEW: From nociception to pain perception: imaging the spinal and supraspinal pathways. *Journal of Anatomy*, 207(1), 19-33.DOI: 10.1111/j.1469-7580.2005.00428.x.
- BYRNES KR, WAYNANT RW, ILEV IK, WU X, BARNA L, SMITH K, HECKERT R, GERST H AND ANDERS JJ (2006) Light Promotes Regeneration and Functional Recovery and Alters the Immune Response After Spinal Cord Injury. *Lasers in Surgery and Medicine* 36:171–185. DOI 10.1002/lsm.20143
- CAIRNS BE. (2010). Pathophysiology of TMD pain–basic mechanisms and their implications for pharmacotherapy. *Journal of Oral Rehabilitation*, 37(6), 391-410. DOI: 10.1111/j.1365-2842.2010.02074.x.
- CANDELARIO-JALIL E, YANG Y AND ROSENBERG GA. (2009). Diverse roles of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in neuroinflammation and cerebral ischemia. *Neuroscience*, 158(3), 983-994. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2008.06.025.
- CARVALHO CM, LACERDA JA, NETO FPS, CASTRO ICV, RAMOS TA, LIMA FO, LUZ JGC, RAMALHO MJP, SANTOS JN AND PINHEIRO ALB. (2011). Evaluation of laser phototherapy in the inflammatory process of the rat's TMJ induced by carrageenan. *Photomedicine and Laser Surgery*, 29(4), 245-254.
- CARVALHO TT, BORGHI SM, PINHO-RIBEIRO FA, MIZOKAMI SS, CUNHA TM, FERREIRA SH, CUNHA FQ, CASAGRANDE R AND VERRIJR WA. (2015) Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) – induced mechanical hyperalgesia in mice: Role for peripheral TNF α , IL-1 β and IL-10. *European Journal of Pharmacology* 749, 62–72. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.12.023>.
- CASTANIA VA; SILVEIRA JWS; ISSY AC; PITOL DL; CASTANIA ML; NETO AD; DEL BEL EA; DEFINO HLA (2014). Advantages of a combined method of decalcification compared to EDTA. *Microscopy Research and Technique* (Print), v. 78, p. n/a-n/a. DOI: 10.1002/jemt.22451.

- CASTANO AP, DAI T, YAROSLAVSKY I, COHEN R, APRUZZESE WA, SMOTRICH MH AND HAMBLIN MR. (2007) Low-Level Laser Therapy for Zymosan-Induced Arthritis in Rats: Importance of Illumination Time Lasers Surgery and Medicine. 39(6): 543–550. DOI:10.1002/lsm.20516.
- CASTRO MM, RIZZI E, FIGUEIREDO-LOPES L, FERNANDES K, BENDHACK LM, PITOL DL, GERLACH RF, TANUS-SANTOS JE. (2008). Metalloproteinase inhibition ameliorates hypertension and prevents vascular dysfunction and remodeling in renovascular hypertensive rats. *Atherosclerosis*, 198(2), 320-331. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2007.10.011.
- CATERINA MJ & JULIUS D. (1999). Sense and specificity: a molecular identity for nociceptors. *Current Opinion in Neurobiology*, 9(5), 525-530. DOI: 10.1016/S0959-4388(99)00009-4.
- CAUWE B & OPDENAKKER G. (2010). Intracellular substrate cleavage: a novel dimension in the biochemistry, biology and pathology of matrix metalloproteinases. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 45(5), 351-423. DOI:10.3109/10409238.2010.501783.
- CHENG-YOU L, SHIH-CHAN L. (2013) Matrix metalloproteinase-2 and -9 lead to fibronectin degradation in astroglia infected with *Toxoplasma gondii*. *Acta Tropica*, 125, 320– 329. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.11.002>
- CHOI HOON-SEONG, ROHB DAE-HYUN, SEO-YEON YOON, JI-YOUNG MOON, SHEU-RAN CHOI, SOON-GU KWON, SUK-YUN KANG, HO-JAE HAN, HYUN-WOO KIM, ALVIN J. BEITZ, SEOG-BAE OH, JANG-HERN LEE. (2015) Microglial interleukin-1b in the ipsilateral dorsal horn inhibits the development of mirror-image contralateral mechanical allodynia through astrocyte activation in a rat model of inflammatory pain. *PAIN* 156 1046–1059. <http://dx.doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000148>.
- CUNHA TM, VERRI JR, VALERIO DA, GUERRERO AT, NOGUEIRA LG, VIEIRA SM, SOUZA DG, TEIXEIRA MM, POOLE S, FERREIRA SH AND CUNHA FQ (2008) Role of cytokines in mediating mechanical hypernociception in a model of delayed-type hypersensitivity in mice. *European Journal of Pain* 12 1059–1068. DOI:10.1016/j.ejpain.2008.02.003
- DE LEEUW R. *Orofacial Pain: Guidelines for Assessment, Diagnosis, and Management*. 4th ed. Chicago: Quintessence; 2008.
- DESIDERÁ AC; NASCIMENTO GC; GERLACH RF and LEITE-PANISSI CRA. (2015) Laser therapy reduces gelatinolytic activity in the rat trigeminal ganglion during temporomandibular joint inflammation. *Oral Diseases* 21, 652–658. doi:10.1111/odi.12330.
- DIAS FJ, ISSA JPM, BARBOSA APA, DE VASCONCELOS PB, WATANABE JI-SEI, IYOMASA MM (2012) Effects of low-level laser irradiation in ultrastructural morphology, and immunoexpression of VEGF and VEGFR-2 of rat masseter muscle. *Micron* 43 237–244. DOI:10.1016/j.micron.2011.08.005
- DONEGAN M, Kernis M, Cua C, Jasmin L and Ohara PT (2013) Satellite Glial Cell Proliferation in the Trigeminal Ganglia After Chronic Constriction Injury of the Infraorbital Nerve. *Glia*. 61(12): 2000–2008. DOI:10.1002/glia.22571

- DUBLIN P, HANANI M. (2007). Satellite glial cells in sensory ganglia: their possible contribution to inflammatory pain. *Brain, Behavior, and Immunity*, 21(5), 592-598. DOI: 10.1016/j.bbi.2006.11.011.
- DUBNER R, REN K. (2004). Brainstem mechanisms of persistent pain following injury. *Journal of Orofacial Pain*, 18(4), 299-305.
- EDUARDO FP, BUENO DF, FREITAS PM, MARQUES MM, PASSOS-BUENO MR, EDUARDO CP AND ZATZ M. (2008). Stem cell proliferation under low intensity laser irradiation: a preliminary study. *Lasers in Surgery and Medicine*, 40(6), 433-438. DOI: 10.1002/lsm.20646.
- EELS JT, WONG-RILEY MTT, VERHOEVE J, HENRYM, BUCHMAN EV, KANE MP, GOULD LJ, DAS R, JETT M, HODGSON BD, MARGOLIS D, WHELAN HT. (2004) Mitochondrial signal transduction in accelerated wound and retinal healing by near-infrared light therapy. *Mitochondrion* 4: 559–567. doi:10.1016/j.mito.2004.07.033
- EELLS JT, HENRY MM, SUMMERFELT P, WONG-RILEY MTT, BUCHMAN EV, KANE M and WHELAN HT (2003). Therapeutic photobiomodulation for methanol-induced retinal toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100, 3439–3444. DOI:10.1073/pnas.0534746100
- EGEBLAD M AND WERB Z. (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nature Reviews Cancer*, 2(3), 161-174. DOI:10.1038/nrc745.
- EGERMARK I, CARLSSON GE, MAGNUSSON T. (2005). A prospective long-term study of signs and symptoms of temporomandibular disorders in patients who received orthodontic treatment in childhood. *The Angle Orthodontist*, 75(4), 645-650.
- EIDSON LN & MURPHY AZ. Persistent Peripheral Inflammation Attenuates Morphine-Induced Periaqueductal Gray Glial Cell Activation and Analgesic Tolerance in the Male Rat. *J Pain*, 14, 4:1-12, 2013. doi:10.1016/j.jpain.2012.12.010
- ETHELL IM AND ETHELL DW. (2007) Matrix metalloproteinases in brain development and remodeling: synaptic functions and targets. *Journal of Neuroscience Research*, 85:2813–2823. DOI: 10.1002/jnr.21273.
- GAO X AND XING D. (2009). Molecular mechanisms of cell proliferation induced by low power laser irradiation. *Journal of Biomedical Science*, 16(4), 1-16. DOI:http://www.jbiomedsci.com/content/16/1/4.
- GIGO-BENATO Davilene Gigo-Benato, PhD,^{1*} Thiago Luiz Russo, PhD,² Erika Harumi Tanaka,¹ Livia Assis, MS,¹ Tania Fa´tima Salvini, PhD,² and Nivaldo Antonio Parizotto, (2010) Effects of 660 and 780nm Low-Level Laser Therapy on Neuromuscular Recovery After Crush Injury in Rat Sciatic Nerve. *Lasers in Surgery and Medicine* 42:833–842. DOI 10.1002/lsm.20978
- GROEF L, Salinas-Navarro M, Imschoot GV, Libert C, Vandenbroucke RE and Moons L. (2015) Decreased TNF Levels and Improved Retinal Ganglion Cell Survival in MMP-2 Null Mice Suggest a Role for MMP-2 as TNF Sheddase. *Mediators of Inflammation*. Article ID 108617. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/108617>

- GUERRA FD, VIEIRA CP, ALMEIDA MS, OLIVEIRA LP, DE ARO AA, PIMENTEL ER. (2013) LLLT improves tendon healing through increase of MMP activity and collagen synthesis. *Lasers Med Sci*, 28(5):1281-8. DOI: 10.1007/s10103-012-1236-7.
- HANANI M. (2005) Satellite glial cells n sensory ganglia: from form to function. *Brain Research Reviews*, 48:457-476. DOI:10.1016/j.brainresrev.2004.09.001.
- HEBLICH F, ENGLAND S, DOCHERTY RJ. (2001). Indirect actions of bradykinin on neonatal rat dorsal root ganglion neurones: a role for non-neuronal cells as nociceptors. *The Journal of physiology*, 536(1), 111-121. DOI: 10.1111/j.1469-7793.2001.00111.x.
- HUANG YY, CHEN ACH, CARROL JD, HAMBLIN MR. (2009) Biphasic dose response in low level light therapy. *Dose-Response*, 7:358–383, 2009. DOI: 10.2203/dose-response.09-027.Hamblin.
- INOUE K AND TSUDA M. (2009) Microglia and Neuropathic Pain *GLIA* 57:1469–1479. DOI 10.1002/glia.20871.
- ISHIMARU JI, OGUMA Y, GOSS AN. (2000). Matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase in serum and lavage synovial fluid of patients with temporomandibular joint disorders. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 38(4), 354-359. DOI: 10.1054/bjom.2000.0306.
- IWATA K, TASHIRO A, TSUBOI Y, IMAI T, SUMINO R, MORIMOTO T, DUBNER R AND REN K. (1999). Medullary dorsal horn neuronal activity in rats with persistent temporomandibular joint and perioral inflammation. *Journal of neurophysiology*, 82(3), 1244-1253.
- JALAL Fakhreya Y. Jalal, Yi Yang, Jeffrey Thompson, Anita C. Lopez and Gary A. Rosenberg (2012) Myelin Loss Associated With Neuroinflammation in Hypertensive Rats. *Stroke*.43:1115-1122. doi: 10.1161/STROKEAHA.111.643080
- JI RU-RONG, XU ZHEN-ZHONG, WANG X AND LO EH (2009) Matrix metalloprotease regulation of neuropathic pain. *Trends in Pharmacological Sciences* 30 (7) doi:10.1016/j.tips.2009.04.002
- KARU T Pyatibrat L and KLENDO G (1995) Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated in vitro. *Journal of Photochemistry and Photobiology*. 27: 219-223
- KAWASAKI Y, XU Z, WANG X, PARK JY, ZHUANG Z, TAN P, GAO YJ, ROY K, CORFAS G, LO EH, JI R. (2008). Distinct roles of matrix metalloproteases in the early-and late-phase development of neuropathic pain. *Nature medicine*, 14(3), 331-336. DOI:10.1038/nm1723.
- KHUMAN Jugta Khuman,1,2 Jimmy Zhang,1,2 Juyeon Park,1,2 James D. Carroll,3 Chad Donahue,1 and Michael J. Whalen1, (2012) Low-Level Laser Light Therapy Improves Cognitive Deficits and Inhibits Microglial Activation after Controlled Cortical Impact in Mice *JOURNAL OF NEUROTRAUMA* 29:408–417. DOI: 10.1089/neu.2010.1745
- KINDLER S, SAMIETZ S, HOUSHMAND M, GRABE HJ, BERNHARDT O, BIFFAR R, KOCHER T, MEYER G, VEO LZKE H, METELMANN HR AND SCHWAHN C (2012) Depressive and Anxiety Symptoms as Risk Factors for Temporomandibular Joint Pain: A Prospective Cohort Study in the

General Population The Journal of Pain, 13 (12) 1188-1197.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpain.2012.09.004>.

KULEKCIOGLU S, SIVRIOGLU K, OZCAN O, AND PARLAK M. (2003). Effectiveness of low-level laser therapy in temporomandibular disorder. *Scandinavian Journal Rheumatology*, 32(2), 114-118.

LI TIAN, STEFANIDAKIS M, NING L, VAN LINT P, NYMAN-HUTTUNEN H, LIBERT C, ITOHARA S, MISHINA M, RAUVALA H AND GAHMBERG CG. (2007) Activation of NMDA receptors promotes dendritic spine development through MMP-mediated ICAM-5 cleavage *The Journal of Cell Biology*, 178 (4): 13, 687–700. <http://www.jcb.org/cgi/doi/10.1083/jcb.200612097>.

LIN TING, KAI LI, FEI-YU ZHANG, ZHEN-KANG ZHANG, ALAN R. LIGHT AND KAI-YUAN FU (2007) Dissociation of spinal microglia morphological activation and peripheral inflammation in inflammatory pain models. *Journal of Neuroimmunology* 192, 40–48. doi:10.1016/j.jneuroim.2007.09.003

LUKACS M, HAANES KA, MAJLÁTH ZS, TAJTI J, VÉCSEI L, WARFVINGE K AND EDVINSSON L (2015) Dural administration of inflammatory soup or Complete Freund's Adjuvant induces activation and inflammatory response in the rat trigeminal ganglion. *The Journal of Headache and Pain* 16:79. DOI 10.1186/s10194-015-0564-y.

LUND JP, LAVIGNE GJ, DUBNER R, SESSLE BJ. *Dor orofacial – da ciência básica à conduta clínica*. 1^a ed. Quintessence, Rio de Janeiro, Brasil, 2002.

MANICONE AN & McGUIRE JK (2008) Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 19, 34–41. doi:10.1016/j.semcdb.2007.07.003

MCINNES IB, BUCKLEY CD AND ISAACS JD (2015) Cytokines in rheumatoid arthritis — shaping the immunological landscape. *Nature Reviews Rheumatology*. DOI:10.1038/nrrheum.2015.171.

MEDEIROS JS, VIEIRA GF AND NISHIMURA PY. (2005). Laser application effects on the bite strength of the masseter muscle, as an orofacial pain treatment. *Photomedicine and Laser Therapy*, 23(4), 373-376. DOI:10.1089/pho.2005.23.373.

MOALEM G & TRACEY DJ. (2006) Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain. *Brain Research Reviews* 51: 240 – 264.

MORAIS NCR, BARBOSA AM, VALE ML, VILLAYERDE AB, LIMA CJ, COGO JC AND ZAMUNER SR. (2010). Anti-inflammatory effect of low-level laser and light-emitting diode in zymosan-induced arthritis. *Photomedicine and Laser Surgery*, 28(2), 227-232. DOI:10.1089/pho.2008.2422.

NASCIMENTO GC, RIZZI E, GERLACH RF & LEITE-PANISSI CRA. (2013). Expression of MMP-2 and MMP-9 in the rat trigeminal ganglion during the development of temporomandibular joint inflammation. *Brazilian Journal of Medical and Biology Research* 46: 956-967. <http://dx.doi.org/10.1590/1414-431X20133138>

OHTORI S, TAKAHASHI K, MORIYA H, MYERS RR. (2004) TNF- α and TNF- α receptor type 1 upregulation in glia and neurons after peripheral nerve injury studies in murine DRG and spinal cord. *Spine*. 29, 1082–1088.

- PARENT AJ, BEAUDET N, BEAUDRYA H, BERGERONA J, BÉRUBÉ P, DROLETG, SARRETA P, GENDRONA L (2012) Increased anxiety-like behaviors in rats experiencing chronic inflammatory pain. *Behavioural Brain Research*. 229, 160–167. doi:10.1016/j.bbr.2012.01.001
- PARKS WC, WILSON CL AND LÓPEZ-BOADO YS. (2004). Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 4(8), 617-629. DOI:10.1038/nri1418.
- PINTO LG, CUNHA TM, VIEIRA SM, LEMOS HP, VERRI-JR WA, CUNHA FQ, FERREIRA SH. (2010). IL-17 mediates articular hypernociception in antigen-induced arthritis in mice. *Pain*, 148(2), 247-256. *Pain*, 148, 247–256, 2010. DOI: 10.1016/j.pain.2009.11.006.
- POGREL, M.A., CHEN, J.W., AND ZHANG, K. (1997). Effects of low-energy gallium-aluminum-arsenide laser irradiation on cultured fibroblasts and keratinocytes. *Lasers in Surgical Medicine* 20:426–432. DOI: 10.1002/(SICI)1096-9101(1997)20:4<426::AID-LSM8>3.0.CO;2-S
- PURVES D, AUGUSTINE GJ, FITZPATRICK D, KATZ LC, LAMANTIA AS, McNAMARA JO, WILLIAMS SM. *Neuroscience*, 2nd ed., Sunderland (MA), Sinauer Associates, 2001.
- REDDY GK. (2004). Photobiological basis and clinical role of low-intensity lasers in biology and medicine. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*, 22(2), 141-150. DOI:10.1089/104454704774076208.
- REN K. (1999) An improved method for assessing mechanical allodynia in the rat. *Physiology & Behavior*, 67: 711-716.
- REN K & DUBNER R (2010) Interactions between the immune and nervous systems in pain. *Nature Medicine* 16, 11, 1267-1276 . doi:10.1038/nm.2234
- REN K & DUBNER R. (1999) Central nervous plasticity and persistente pain. *Journal of Orofacial Pain*, 13:155-163.
- REN K & DUBNER R. (1993). NMDA receptor antagonists attenuate mechanical hyperalgesia in rats with unilateral inflammation of the hindpaw. *Neuroscience Letters*, 163(1), 22-26. DOI: 10.1016/0304-3940(93)90220-F
- RIZZI CF, MAURIZ JL, FREITAS CORRÊA DS, MOREIRA AJ, ZETTLER CG, FILIPPIN LI, MARRONI NP & GONZÁLEZ-GALLEGO J. (2006). Effects of low-level laser therapy (LLLT) on the nuclear factor (NF)- κ B signaling pathway in traumatized muscle. *Lasers in Surgery and Medicine*, 38(7), 704-713. DOI 10.1002/lsm.20371
- SHEN CC, YANG Y, HUANG TB, CHAN SC & LIU BS. (2013). Neural regeneration in a novel nerve conduit across a large gap of the transected sciatic nerve in rats with low-level laser phototherapy. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 101(10), 2763-2777. DOI: 10.1002/jbm.a.34581
- SHUBAYEV VI & MYERS RR (2002) Endoneurial remodeling by TNF- α and TNF- α releasing proteases. A special and temporal co-localization study in painful neuropathy. *Journal of the Peripheral Nervous Sysytems* 7: 28-36.
- SILVEIRA PCL, Silva LA, Pinho ca, Souza P S, Ronsani MM, Scheffer DL and Pinho ra. (2013) Effects of low-level laser therapy (GaAs) in an animal model of muscular damage induced by trauma. *Lasers in Medical Science* 28:431–436. DOI 10.1007/s10103-012-1075-6.

- SPATARO LE, SLOANE EM, MILLIGAN ED, WIESELER-FRANK J, SCHOENIGER D, JEKICH BM, BARRIENTOS RM, MAIER SF, WATKINS LR. (2004). Spinal gap junctions: potential involvement in pain facilitation. *Journal of Pain*, 5(7), 392-405. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpain.2004.06.006>
- SONG SHENG, ZHOU F AND CHEN WR (2012). Low-level laser therapy regulates microglial function through Src-mediated signaling pathways: implications for neurodegenerative diseases. *Journal of Neuroinflammation*. 9:219, 2-17. <http://www.jneuroinflammation.com/content/9/1/219>.
- TAFUR J & MILLS PJ. (2008). Low-intensity light therapy: Exploring the role of redox mechanisms. *Photomedicine and Laser Surgery*, 26(4), 323-328. DOI: 10.1089/pho.2007.2184
- TANAKA A, KUMAGAI S, KAWASHIRI S, TAKATSUKA S, NAKAGAWA K, YAMAMOTO E, MATSUMOTO N. (2001) Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 in synovial fluid of the temporomandibular joint accompanied by anterior disc displacement. *Journal of Oral Pathology and Medicine*. 30: 59–64.
- VERNAL R, VELASQUEZ E, GAMONAL J, GARCIA-SANZ JA, SILVA A, SANZ M (2008) Expression of proinflammatory cytokines in osteoarthritis of the temporomandibular joint. *archives of oral biology* 53 910 – 915. doi:10.1016/j.archoralbio.2008.04.004
- VERRI JR WA, CUNHA TM, PARADA CA, POOLE S, CUNHA FQ AND FERREIRA SH. (2006) *Pharmacology & Therapeutics* 112, 116–138. DOI:10.1016/j.pharmthera.2006.04.001.
- VESIN MF, URADE Y, HAYAISHI O, DROZ B. (1995) Neuronal and glial prostaglandin D synthase isozymes in chick dorsal root ganglia: a light and electron microscopic immunocytochemical study. *Journal of Neuroscience*, 15: 470–476.
- WADHWA S. & KAPILA S. (2008) TMJ Disorders: Future Innovations in Diagnostics and Therapeutics. *Journal of Dental Education*; 72, 8: 930–947.
- WATKINS LR & MAIER SF. (2002) Beyond neurons: evidence that immune and glial cells contribute to pathological pain states. *Physiological Reviews*, 82: 981–1011.
- YOUNG MR, BLACKBURN-MUNRO G, DICKINSON T, JOHNSON MJ, ANDERSON H, NAKALEMBE I AND FLEETWOOD-WALKER SM. (1998) Antisense Ablation of Type I Metabotropic Glutamate Receptor mGluR1 Inhibits Spinal Nociceptive Transmission. *Journal of Neuroscience*, 18, 23: 10180–10188.
- YOUNGER JW, SHEN YF, GODDARD G, MACKEY SC (2010) Chronic myofascial temporomandibular pain is associated with neural abnormalities in the trigeminal and limbic systems. *PAIN*. 149, 222–228. doi:10.1016/j.pain.2010.01.006.
- ZHOU QQ, IMBE H, DUBNER R, REN K. (1999). Persistent Fos protein expression after orofacial deep or cutaneous tissue inflammation in rats: implications for persistent orofacial pain. *Journal of Comparative Neurology*, 412(2), 276-291. DOI: 10.1002/(SICI)1096-9861(19990920)412:2<276::AID-CNE7>3.0.CO;2-9.

Anexo I

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO CEUA – FORP/USP

Certificamos que o Protocolo nº 2013.1.1111.58.7 sobre a pesquisa intitulada "Análise da expressão de metaloproteinases da matriz no gânglio trigeminal e de citocinas inflamatórias no líquido sinovial de ratos portadores de inflamação persistente da articulação temporomandibular submetidos a laserterapia de baixa intensidade", sob a responsabilidade da Profa. Dra. Christie Ramos Andrade Leite Panissi, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, USP, APROVADO em reunião da CEUA de 19/02/2014 (288 animais), com alterações aprovadas em reunião da CEUA de 29/04/2015 (totalizando 440 animais).

We hereby certify that the protocol nº 2013.1.1111.58.7 regarding the research entitled "Analysis of expression of matrix metalloproteinases in the trigeminal ganglion and inflammatory cytokines in the synovial fluid of rats with persistent inflammation of the temporomandibular joint subjected to low-intensity laser", under the responsibility of Profa. Dra. Christie Ramos Andrade Leite Panissi, is in accordance with the Ethical principles in animal research adopted by the Animal Research Ethics Committee of the School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil, was approved in 19/02/2014 (288 animals), with changes approved in 29/04/2015 (totalizing 440 animals).

Ribeirão Preto, 29 de abril de 2015.

Profa. Dra. Andriara De Rossi Daldegan
Coordenadora da CEUA – FORP/USP

CEUA - FORP/USP

1