Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto

Amanda de Carvalho Desiderá

**AVALIAÇÃO DO USO DE LASERTERAPIA DE BAIXA INTENSIDADE NA ALODINIA
MECÂNICA, NA HIPERALGESIA OROFACIAL E NA EXPRESSÃO DE GELATINASES
NO GÂNGLIO TRIGEMINAL EM RATOS PORTADORES DE INFLAMAÇÃO DA
ARTICULAÇÃO TEMPOROMANDIBULAR**

Ribeirão Preto

2013

Amanda de Carvalho Desiderá

**AVALIAÇÃO DO USO DE LASERTERAPIA DE BAIXA INTENSIDADE NA ALODINIA
MECÂNICA, NA HIPERALGESIA OROFACIAL E NA EXPRESSÃO DE GELATINASES
NO GÂNGLIO TRIGEMINAL EM RATOS PORTADORES DE INFLAMAÇÃO DA
ARTICULAÇÃO TEMPOROMANDIBULAR**

Dissertação 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 de Concentração: Biologia Oral

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

VERSÃO ORIGINAL

Ribeirão Preto

2013

**AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO DO TEOR TOTAL OU PARCIAL DESTES
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

Avaliação do uso de laser terapia de baixa intensidade na alodinia mecânica, na hiperalgesia orofacial e na expressão de gelatinases no gânglio trigeminal em ratos portadores de inflamação da articulação temporomandibular. Ribeirão Preto, 2013.

76p. : il. ;30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Área de Concentração: Biologia Oral.

Orientador: Leite-Panissi, Christie Ramos Andrade

1. Dor Orofacial. 2. Inflamação Temporomandibular. 3. Hiperalgesia Orofacial. 4. Alodinia Mecânica. 5. Metaloproteinases da Matriz Extracelular. 6. Laserterapia de Baixa Intensidade.

FOLHA DE APROVAÇÃO**Amanda de Carvalho Desiderá**

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

Área de Concentração: Biologia 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: _____

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 minha família, tios, irmão, primos, por me acolher e me apoiar quando mais precisei.

A meu namorado, Fernando, por estar sempre ao meu lado, ajudando e apoiando em todas as etapas dessa fase da minha vida.

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, pela amizade, pela paciência e pelos ensinamentos, e, acima de tudo, por ser uma orientadora atenciosa, zelosa e sempre disposta a ajudar.

À Professora Raquel Fernanda Gerlach, por ter cedido seu laboratório para a realização de vários experimentos deste trabalho.

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

À minha amiga e doutoranda Glauce Crivelaro do Nascimento, por toda amizade e colaboração durante meu mestrado.

À Professora Mamie Mizusaki Iyomasa, pelo auxílio, atenção e educação para aconselhar-me em alguns momentos deste trabalho.

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

Aos meus amigos do laboratório, Ana Paula, Bruna, Daniela, Eveline, Gabriele, Jardel, Priscila, Patrícia, Richard e Vinicius, pelo apoio e amizade.

Aos amigos que estiveram presentes durante a realização de meu mestrado, pela amizade, o carinho e a atenção de todos.

A técnica Patrícia Adriana Basile ao apoio técnico durante a execução dos experimentos.

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 secretários, Regiane de C. Tirado Damasceno, Fernanda Thalita de Freitas, Isabel Cristina Galino Sola, Leandro Marin da Silva, Regiane Cristina Moi Sacilotto, que prestaram inestimável auxílio nos aspectos formais que aqui foram despendidos.

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

Ao CNPQ, pelo auxílio financeiro que permitiu a compra de materiais para a execução do projeto.

EPÍGRAFE

“A educação tem raízes amargas, mas os seus frutos são doces”

Aristóteles

RESUMO

DESIDERÁ, A.C. Avaliação do uso de laser terapia de baixa intensidade na alodinia mecânica, na hiperalgesia orofacial e na expressão de gelatinases no gânglio trigeminal em ratos portadores de inflamação da articulação temporomandibular.

A sintomatologia dolorosa é um dos principais estímulos capaz de caracterizar ações nocivas e, portanto, é um importante mecanismo de defesa. No estudo da dor orofacial, as alterações musculoesqueléticas de cabeça, pescoço e face caracterizam um grupo de sintomatologia dolorosa, denominadas de Disfunções Temporomandibulares (DTMs). As DTMs possuem etiologia multifatorial, incluindo alterações estruturais, sensoriais e influências emocionais-motivacionais, atingindo cada vez mais indivíduos na sociedade atual. Para o tratamento desta patologia é necessário o conhecimento detalhado dos mecanismos moleculares e fisiológicos envolvidos, os quais têm sido objetivo de alguns pesquisadores nos últimos anos. Entretanto, ainda se faz necessário a continuidade deste estudo para caracterização minuciosa das DTMs, com novas possibilidades de intervenção e tratamento da sintomatologia dolorosa. Como principais fatores associados à DTM, a inflamação e as alterações estruturais e moleculares da articulação temporomandibular (ATM) desempenham importante papel nesta patologia. Ainda, sabe-se que a dor, em particular a dor inflamatória, promove a ativação de mecanismos locais e sistêmicos, os quais liberam mensageiros fundamentais para a modulação da resposta do organismo, como proteínas e citocinas inflamatórias gerando a inflamação propriamente dita. Segundo a literatura, durante o estabelecimento da resposta inflamatória, muitas proteínas, principalmente as denominadas, metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs), são responsáveis pela reabsorção de colágeno, e de outras macromoléculas estão intimamente envolvidas neste processo. Além disso, as MMPs também participam da reorganização no sistema nervoso que ocorre juntamente com os processos inflamatórios

persistentes. Desde meados da década de 90, tem sido utilizado com considerável sucesso a laserterapia de baixa intensidade para o tratamento das DTMs na clínica odontológica. Dentro desta perspectiva, estudos demonstraram que este método de tratamento possui atividade antiinflamatória e colaboram no reparo tecidual. Estudo recente demonstrou que o desenvolvimento da inflamação bilateral das ATMs promoveu alteração das MMPs no gânglio trigeminal, bem como desencadeou um processo de alodinia mecânica e hiperalgesia orofacial. Desta forma, o presente projeto teve como objetivo, verificar se o uso da laserterapia de baixa intensidade (LLLT) altera a expressão das MMPs no gânglio trigeminal, nas diferentes fases de desenvolvimento da inflamação intraarticular, (1, 3, 5, 7 e 10 dias) bem como na alodinia mecânica e da hiperalgesia orofacial em ratos. Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que a LLLT em ratos inflamação persistente das ATMs, induzida por administração de Adjuvante Completo de Freund, reduziu a alodinia mecânica, avaliada pelo teste de von Frey, bem como a hiperalgesia orofacial no teste da formalina. Adicionalmente, observou-se redução do aumento da MMP-9 e da MMP-2, nos ratos tratados com LLLT.

ABSTRACT

DESIDERÁ, A.C. Evaluation of low level laser therapy in the mechanical allodynia, in the orofacial hyperalgesia and in the expression of gelatinases on trigeminal ganglion in rats with inflammation temporomandibular joint.

Painful symptoms is one of the main stimuli that characterizing threatening situation and represent an important defense mechanism. In the study of orofacial pain, musculoskeletal abnormalities of the head, neck and face featuring a group of painful symptoms, which are known as Temporomandibular Disorders (TMD). The TMDs have a multifactorial etiology, including structural changes, sensory and emotional-motivational influences. For the treatment of this pathology is necessary detailed knowledge of the physiological and molecular mechanisms involved, which have been the goal of several researchers in the last few years. However, it is still necessary to continue this study for detailed characterization of TMDs, with new possibilities for intervention and treatment of painful symptom. It is noteworthy that inflammation, as well as molecular and structural changes of the temporomandibular joint (TMJ) play an important role in TMD. Also, it is known that pain, particularly inflammatory pain, promotes the activation of local and systemic mechanisms which release essential mediators, such as proteins and inflammatory cytokines generating inflammation itself. Furthermore, during the establishment of the inflammatory response, many proteins, in particular, the extracellular matrix metalloproteinases (MMPs) are responsible for the resorption of collagen and other macromolecules. Moreover, MMPs also participate in the reorganization that occurs in the nervous system during persistent inflammatory processes. Since the 90s, has been used with considerable success to low intensity laser therapy for the TMD treatment in clinical dentistry. In addition, studies have shown that this therapy has antiinflammatory activity and collaborate in tissue repair. A recent study has demonstrated that the development of bilateral inflammation of TMJs promote alteration of MMPs expression in the trigeminal ganglion, and

triggered a process of orofacial mechanical allodynia and hyperalgesia. Thus, this study aimed to determine whether the use of low intensity laser therapy (LLLT) alters the expression and activity of MMPs in the trigeminal ganglion, at different stages of development of intraarticular inflammation (1,3, 5, 7 and 10 days), as well as mechanical allodynia and hyperalgesia orofacial in rats. So, the results showed that LLLT, reduced mechanical allodynia (as measured by the von Frey test), and orofacial hyperalgesia (formalin test) in rats submitted to persistent inflammation of TMJs induced by administration of Freund's Complete Adjuvant (CFA). Additionally, whereas CFA administration induced an increase of MMP-9 and MMP-2 expression in the trigeminal ganglion, LLLT reduce these effects.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1:** Fotografia mostrando o local da aplicação de CFA ou SAL na região da ATM. 30
- FIGURA 2:** Fotografia representativa da avaliação da sensibilidade mecânica orofacial utilizando o anestesiômetro modelo von Frey. 31
- FIGURA 3:** Fotografia representativa de um rato durante a realização do teste de formalina orofacial na caixa de observação. 32
- FIGURA 4:** Fotografia representativa de uma sessão de laser terapia de baixa intensidade na região da articulação temporomandibular em ratos. a aplicação foi realizada bilateralmente com duração de 20 segundos. 33
- FIGURA 5:** Fotomicrografia de corte histológico longitudinal (20 µm de espessura) de um gânglio trigeminal representativo de rato utilizado em nossos experimentos. (coloração H.E.; aumento de 20X). 35
- FIGURA 6:** Sensibilidade mecânica orofacial. Limiar de retirada da face após a aplicação de estímulo mecânico graduado (teste de von Frey) antes (Basal) ou em diferentes dias após o tratamento (3, 5, 7, e 10 dias) em ratos submetidos à administração de solução salina (SAL) ou Adjuvante Completo de Freund (CFA) intraarticular, e que receberam (LASER) ou não laser terapia de baixa intensidade. 45
- FIGURA 7:** Sensibilidade nociceptiva orofacial. Resposta de coceira da face após a aplicação de formalina 1,5 % orofacial, 10 dias após a administração intraarticular salina 0,9% ou CFA e que receberam ou não tratamento com laser de baixa intensidade. 47
- FIGURA 8:** Fotografia de zimogramas representativos de gânglio trigeminal de ratos. amostras de gânglio de ratos de diferentes períodos experimentais, 1,3, 5, 7 e 10 dias após a administração de CFA ou salina 0,9%, bilateral na região das ATMs. Na figura está apresentada a expressão de MMP-9 (92kDa) e MMP-2 (75 kDa, 72 kDa e 64 kDa). 50
- FIGURA 9:** Avaliação quantitativa da expressão de gelatinases MMP-9 (unidades arbitrárias) em gânglios trigeminais em diferentes períodos experimentais. 51
- FIGURA 10:** Avaliação quantitativa da expressão de gelatinases MMP-2 (75 kDa, 72 kDa e 64 kDa) (unidades arbitrárias) em gânglios trigeminais em diferentes períodos experimentais. 52
- FIGURA 11:** Fotomicrografias representativas de cortes longitudinais (10 µm) do tronco encefálico de ratos, região do gânglio trigeminal, evidenciando a atividade gelatinolítica das MMPs no 1º dia ou 3º, 5º, 7º e 10º dias. 54
- FIGURA 12:** Atividade gelatinolítica de metaloroteínases da matriz extracelular. amostras de gânglio trigeminal de ratos submetidos à aplicação intraarticular, bilateralmente, de CFA ou salina 0,9% e tratados com LLLT ou não, após o tempo de sobrevivência de 1, 3, 5, 7 e 10 dias. 55

LISTA DE ABREVIATURAS

Ácido ribonucleico mensageiro	RNAm
Articulação temporomandibular	ATM
Cálcio	Ca ²⁺
Células Gliais Satélites	CGSs
Adjuvante Completo de Freund	CFA
Disfunção temporomandibular	DTM
Estimulação Elétrica Neural Transcutânea	TENS
Espécies Oxigênio-Reativas	ROS
Interleucina 1 β	IL-1 β
Interleucina 6	IL-6
Laser Terapia de Baixa Intensidade	LLLT
Metaloproteinases da matriz extracelular	MMP
Prostaglandina E ₂	PGE ₂
Sistema Nervoso Central	SNC
Solução de formalina 1,5%	FOR
Solução salina 0,9%	SAL
Zinco	Zn ⁺

Sumário

<i>Introdução</i>	16
<i>Sensibilidade Dolorosa</i>	17
<i>Dor orofacial</i>	18
<i>Metaloproteinases da Matriz Extracelular</i>	20
<i>Laser Terapia de Baixa Intensidade</i>	23
<i>Objetivos</i>	26
<i>Materiais e Métodos</i>	28
1. <i>Animais</i>	29
2. <i>Indução de inflamação persistente na ATM.</i>	29
3. <i>Avaliação da sensibilidade mecânica orofacial.</i>	30
4. <i>Avaliação da sensibilidade nociceptiva orofacial.</i>	31
5. <i>Tratamento com laser de baixa intensidade.</i>	32
6. <i>Avaliação da presença das gelatinases no gânglio trigeminal.</i>	34
7. <i>Remoção do gânglio trigeminal</i>	34
8. <i>Extrato de gânglio trigeminal.</i>	35
9. <i>Zimografia</i>	35
10. <i>Zimografia in situ</i>	37
11. <i>Drogas</i>	38
12. <i>Eutanásia</i>	38
13. <i>Análise dos Resultados</i>	38
14. <i>Protocolos experimentais</i>	39
<i>Resultados</i>	43
<i>Discussão</i>	56
<i>Conclusões</i>	63
<i>Referências Bibliográficas</i>	65

Introdução

Sensibilidade Dolorosa

A dor pode ser definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano tissular real ou em potencial ou descrita em termos de tais lesões (MERSKEY & BOGDUK, 1994; MILLAN, 1999). A dor representa assim, importante ganho do ponto de vista evolutivo, pois funciona como um mecanismo sinalizador contra danos teciduais ou elementos potencialmente prejudiciais ao organismo, evocando resposta sensorial e motora de proteção (AGUGGIA, 2003; CORTELLI & PIERANGELI, 2003). A condição dolorosa pode ser classificada de acordo com o critério temporal em aguda ou crônica. A dor aguda é caracterizada pela injúria substancial de um tecido com a subsequente ativação dos nociceptores locais. Apresenta assim, valor biológico adaptativo, uma vez que se desenvolve em resposta a um estímulo potencialmente nocivo ao tecido. Sendo assim, é um importante sinalizador da integridade tecidual, iniciando respostas protetoras (SERRA, 1999; AGUGGIA, 2003; CORTELLI & PIERANGELI, 2003). Em contrapartida, a dor crônica não possui esta característica protetora, perdendo a função biológica e caracterizando-se pela sua natureza multidimensional, na qual além dos fenômenos neurofisiológicos, os aspectos psicológicos, cognitivos, comportamentais, sociais, familiares e vocacionais podem modular a experiência dolorosa (LOESER e cols., 1999). No mecanismo de percepção da dor orofacial, os neurônios que respondem preferencialmente a estímulos nocivos são denominados nociceptores (neurônios de primeira ordem). Eles conduzem as informações nociceptivas ao sistema nervoso central (SNC), e seus corpos celulares encontram-se nos gânglios das raízes dorsais, adjacente à medula espinal (CATERINA e cols., 1999) ou no gânglio trigeminal (BASBAUM & JESSEL, 2000), quando pensamos em estímulos orofaciais. O estímulo nociceptivo inicia-se nos terminais (terminações nervosas livres) dos neurônios de primeira ordem, os quais realizam sinapse com neurônios de segunda ordem, do corno dorsal da medula espinal ou do núcleo espinal do trigêmeo. Por sua vez, os axônios dos neurônios de segunda ordem cruzam a linha média e ascendem em direção ao córtex, pelo sistema anterolateral, principalmente, via trato

espinotrigemeotalâmico. Os axônios de neurônios de segunda ordem conectam-se com 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).

Dor orofacial

Considerando a dor orofacial, esta sintomatologia apresenta alta prevalência, sendo presente em 40% a 60% da população (CONTI e cols., 1996; PEDRONI e cols., 2003). Embora possa ocorrer em qualquer idade, é mais comum entre indivíduos de 13 a 35 anos e quatro vezes mais prevalente em mulheres do que em homens (CARLSSON & DEBOEVER, 2000). Dentre as origens da dor orofacial, as alterações musculoesqueléticas, tais como as desordens da articulação temporomandibular (ATM) incluem um grupo heterogêneo de patologias usualmente acompanhadas de dor na região das ATMs e dos músculos mastigatórios, limitação da abertura bucal e dores de cabeça e da região do pescoço. Estas condições têm sido denominadas conjuntamente de desordens temporomandibulares (DTMs). A causa exata das DTMs ainda não é completamente compreendida, mas acredita-se que envolva fatores estruturais, fisiológicos, comportamentais e ambientais. Assim, as DTMs possuem origem multifatorial caracterizada por quadros agudos ou, principalmente, crônicos. Em adição, a musculatura mastigatória, a articulação temporomandibular e a região cervical compõem estruturas envolvidas nesta patologia (FAVERO, 1999; COSTA e cols., 2004).

Com relação à ATM, esta se caracteriza como uma articulação sinovial formada pelo côndilo mandibular a qual se encaixa na fossa mandibular do osso temporal (OKESON, 1998). As superfícies articulares das ATMs são cobertas com tecido conjuntivo denso fibroso e sem cartilagem hialina (DUBRUL, 1980). Essa é uma característica importante, pois o tecido conjuntivo fibroso tem maior capacidade de auto-reparação do que a cartilagem hialina. Desta maneira, o tratamento das

condições artríticas das ATMs difere de outras articulações sinoviais (MEIKEL, 1992). Em adição, a inflamação que ocorre na região das ATMs tem sido considerada como a principal causa da dor relatada pelos pacientes portadores de DTMs (YAMASAKI e cols., 2008). Esta inflamação pode ocorrer na membrana sinovial (sinovite) e/ou na cápsula (capsulite), podendo resultar 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). Aprofundando-nos, estudos neuroquímicos mostram que a inflamação na ATM promove a produção de substâncias pró-inflamatórias, incluindo taquicinininas como a substância P e peptídeos como o CGRP (CARLESSON e cols., 1997). Além desses mediadores, pacientes com DTM apresentam altos níveis da citocina IL-1 β no fluido sinovial (HARPER e cols., 2000).

Em laboratório, existem distintos modelos animais utilizados para o estudo da inflamação da ATM, tais como: administração intraarticular de Adjuvante Completo de Freund (CFA), óleo de mostarda, formalina, adenosina trifosfato (ATP) ou glutamato (BEREITER e cols., 2002; IMBE & REN, 1999; LAM e cols., 2005; OLIVEIRA e cols., 2005; ROVERONI e cols., 2001). Dentre eles, o CFA é considerado um irritante confiável, capaz de produzir inflamação de longa duração após sua injeção local e de gerar dor aguda (YAMASAKI e cols., 2008). Em particular, a administração de CFA intraarticular bilateral nas ATMs de ratos promoveu alodinia mecânica e hiperalgesia orofacial 10 dias após o início do desenvolvimento da inflamação (NASCIMENTO, 2011). Além disso, em estudo comparativo entre os efeitos do CFA e da injeção de formalina, observou-se reações inflamatórias exacerbadas com o uso do CFA (TING e cols., 2007). A inflamação das ATMs está associada com dor tecidual profunda, geralmente referida para a pele (IWATA e cols., 1999; IMBE e cols., 2001). Isso permite avaliar alterações na sensibilidade mecânica e nociceptiva sem a necessidade de manipulação invasiva.

Metaloproteinases da Matriz Extracelular

Com relação à dor de origem inflamatória, estudos demonstraram que as macromoléculas da matriz extracelular (MEC) podem participar do desenvolvimento do processo inflamatório (KAWASAKI e cols., 2008, CHANG & WERB., 2001). Especificamente, tem sido elucidado o envolvimento das enzimas proteolíticas extracelulares secretadas localmente pelas células: às classes das metaloproteases e das serinoproteases (SORSA e cols., 2004). De fato, evidências mostraram que, entre as possíveis proteinases, as metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs) desempenham papel principal na reabsorção fisiológica do colágeno e de outras macromoléculas durante o desenvolvimento e a remodelação tecidual pós-natal bem como, na reabsorção patológica associada, por exemplo, à invasividade de tumores malignos, à reabsorção de estruturas na doença periodontal, à destruição de articulações na artrite reumatóide (KRANE, 1994) e em doenças neurodegenerativas (KAWASAKI e cols., 2008).

As MMPs constituem uma família de mais de 20 metaloenzimas que clivam vários componentes da MEC, incluindo o colágeno intersticial e o da membrana basal, a fibronectina, a laminina e as proteoglicanas, liberando fragmentos com atividades biológicas distintas. Estas MMPs são secretadas como proenzimas latentes e requerem ativação por meio de clivagem proteolítica do domínio amino-terminal rico em cisteína. Em adição, sua atividade depende da presença de zinco. Várias subclasses de MMPs têm sido definidas e agrupadas de acordo com a especificidade ao substrato: collagenases, gelatinases, estromelisinases, MMP tipo membrana (MTMMPs) e elastases. Ainda, há grande similaridade estrutural entre os membros de cada família (MCCAWLEY e cols., 2000). Desta maneira, as MMPs collagenases -1, -2 e -3 são as MMP-1, -8 e -13, respectivamente. Estas MMPs degradam as moléculas de colágeno intersticial tipos I, II e III, além de digerirem outras moléculas da MEC. As MMPs gelatinases A (MMP-2) e B (MMP-9) degradam principalmente colágeno desnaturado (gelatinas) e colágeno tipo IV, enquanto as MMPs estromelisinases 1 e 2 (MMP-3 e -10) podem degradar fibronectina e proteoglicanas (PEREIRA e cols., 2006). A atividade

proteolítica das MMPs é primariamente controlada pelos inibidores de metaloproteinases teciduais (TIMPs). Estes são pequenas proteínas que bloqueiam a atividade das MMPs ligando-se ao sítio de zinco altamente conservado. Atualmente quatro TIMPs são conhecidos, e sabe-se que sua ação inibitória é seletiva, reversível e ocorre de forma balanceada. A regulação coordenada entre TIMPs e MMPs direciona a clivagem e a liberação de fatores de crescimento importantes e também de receptores de superfície celular (CHANG & WERB, 2001). A expressão dos TIMPs é observada durante a remodelação tecidual fisiológica, contribuindo para a manutenção do equilíbrio metabólico e estrutural da MEC. Alterações na homeostasia entre as MMPs e TIMPs têm sido identificadas em doenças associadas com a remodelação não controlada da MEC, como artrite, câncer, doenças cardiovasculares, nefrites, desordens neurológicas e fibroses, onde consequentemente, há maior degradação da MEC (NAGASE & WOESSNER, 1999; STAMENKOVIC, 2000). O TIMP do tipo 1 (TIMP-1) e do tipo 2 (TIMP-2) representam membros bem caracterizados desta família de inibidores, e apresentam atividade inibitória contra as formas ativas de toda a família de MMPs (HOWARD e cols., 1991; FOLGUERAS 2004).

Considerando que grande parte da dor orofacial é de origem inflamatória, é possível que as MMPs participem ativamente dos processos dolorosos orofaciais. Dentro deste contexto, em indivíduos portadores de DTM observou-se aumento significativo da concentração de um subtipo de MMP (MMP-3) no líquido sinovial da ATM quando comparado com indivíduos saudáveis (ISHIMARU e cols., 2000). Uma vez que neste estudo não foi encontrada correlação entre a concentração de MMP-3 e a morfologia da ATM, é possível que esta metaloproteinase esteja envolvida no processo inflamatório observado na ATM (ISHIMARU e cols., 2000). De fato, em processos inflamatórios articulares, as citocinas inflamatórias estimulam a síntese de MMPs, promovendo alteração do equilíbrio entre as metaloproteinases e os inibidores teciduais das metaloproteinases, resultando em degradação da matrix colagenosa (SHINMEI e cols., 1989). Sendo a cartilagem articular da ATM composta predominantemente por fibrocartilagem, com grande

quantidade de fibras colágenas, as MMPs participam ativamente nas desordens da ATM, uma vez que as enzimas gelatinases (colagenase tipo IV) degradam os colágenos tipo IV, V, VII e a elastina. Além disso, a gelatinase-A (MMP-2) e a gelatinase-B (MMP-9), presentes no côndilo mandibular, estão intimamente relacionadas aos processos inflamatórios locais. Nesta perspectiva, foi demonstrada correlação entre a presença da MMP-2 no líquido sinovial de pacientes com desordens temporomandibulares e os achados radiográficos indicando degeneração do disco e da cartilagem articular (MIZUI e cols., 2001). Em adição, as concentrações de MMP-9 encontram-se aumentadas no fluido crevicular gengival de pacientes com periodontite crônica generalizada e de pacientes com gengivite; o que sugere que esta enzima pode estar envolvida também no complexo processo de destruição tecidual que ocorre nestes processos inflamatórios (FIGUEREDO e cols., 2003).

Ampliando as funções das MMPs, foi mostrado o envolvimento destas proteinases na modulação da dor neuropática (KAWASAKI e cols., 2008). Neste estudo, a administração via intratecal de forma aguda ou prolongada de um inibidor não específico das MMPs (GM6001) reduziu significativamente a alodinia mecânica, avaliada por meio do teste de von Frey na superfície plantar da pata traseira, após a injúria de nervo espinal. Considerando estes achados, os autores sugerem a possibilidade da participação das MMPs no desenvolvimento da dor neuropática, devido a desmielinização que ocorre por degradação da proteína mielínica básica no SNC (CHANDLER e cols., 1995). Corroborando esta hipótese, em camundongos *knockout* para MMP-9 a desmielinização não ocorreu mesmo após 10 dias da lesão do nervo ciático (CHATTOPADHYAY e cols., 2007). Ainda, KAWASAKI e cols. (2008) demonstrou que as gelatinases MMP-2 e MMP-9 são expressas no gânglio espinal, em resposta ao desenvolvimento de dor neuropática induzida por pinçamento de nervo em ratos. Neste estudo ocorreu aumento da expressão da MMP-9 nas fases iniciais do desenvolvimento da inflamação, enquanto que o aumento da expressão da MMP-2 foi observado na fase tardia. Desta forma, sugere-se que a MMP-9 participaria do desenvolvimento da inflamação

inicial, enquanto que a MMP-2 seria responsável pela fase de manutenção da inflamação crônica ou persistente .

Laser Terapia de Baixa Intensidade

Devido ao fato da prevalência de sintomatologia dolorosa em pacientes portadores de DTM, diferentes tratamentos são empregados como objetivo de reduzir a dor, melhorando a qualidade de vida do paciente. Dentre os tratamentos empregados, uso de medicamentos, tais como analgésicos e antiinflamatórios. Entretanto, o uso de métodos alternativos como a acupuntura e o uso terapêutico do laser de baixa intensidade (LLLT) tem se tornado cada vez comum. Dentre eles, a terapia com laser de baixa intensidade tem sido eficaz para o alívio da dor na região da ATM, bem como, nos músculos mastigatórios, na dor irradiada para a face, para o pescoço e para o ombro, decorrentes de DTM (FRICTON, 2004). Ainda, estudos mostram que a laser terapia atual de forma dose dependente, e em alguns casos não observa-se melhora no quadro de sintomatologia dolorosa (AMARAL e cols., 2001). Atualmente o uso da terapia com laser de baixa intensidade tem se tornado mais frequente, devido ao seu efeito analgésico e antiinflamatório, bem como pelo relaxamento muscular (NUNEZ e cols., 2006), pela redução da fadiga, aumento da força de mordida levando a diminuição da dor orofacial (MEDEIROS e cols., 2005).

Embora a laser terapia apresente resultados benéficos observados em trabalhos clínicos (KULEKCIOGLU e cols., 2003), ainda não é bem compreendido o seu efeito no âmbito morfofisiológico. Trabalhos utilizando a laser terapia de baixa intensidade (LLLT) para o tratamento clínico de sintomatologia dolorosa iniciaram-se em 1968, e desde então, esta metodologia tem sido amplamente aprimorada (REDDY, 2004). Dentro desta perspectiva, nas últimas décadas foi desenvolvido um aparato de laser de baixa intensidade, cujo meio ativo do emissor de luz é constituído de gálio-alumínio-arseneto (GaAlAs). É possível que a utilização de laser de baixa

intensidade pode aumentar a proliferação de células satélites, precursoras de células musculares em processo de regeneração e neoformação muscular (BEM-DOV e cols., 1999), bem como intensificar novas sínteses proteicas da tradução em mioblastos da musculatura esquelética (SHEFER e cols., 2003).

Estudos mostraram que a laserterapia de baixa intensidade apresenta resultado melhor em relação à estimulação elétrica neural transcutânea (TENS) (NUNEZ e cols., 2006). Além disso, em ratos, a laserterapia de baixa intensidade reduziu a resposta inflamatória induzida por trauma muscular, bloqueou os efeitos das espécies oxigênio reativas (ROS) liberadas e ativou o fator nuclear kappa B (NF-kappa B) (RIZZI e cols., 2006). No mais, as ROS são substâncias quimiotáticas para colágeno, em casos de cicatrização a inflamação leva ao aumento de produção de ROS e consequentemente de colágeno, gerando um tecido cicatricial diferente do original, ou seja, sem função. Ainda, existe uma relação entre estresse oxidativo e fibrose. A LLLT é descrita como um tratamento efetivo para prevenir o estresse oxidativo em tecidos com inflamação (FILLIPIN e cols., 2005). Em adição, o uso de laser terapia preveniu a degeneração do musculoesquelético, gastrocnêmico, o qual foi lesionado por oclusão do suprimento de sangue seguida por reperfusão, isso se deve, provavelmente, pela indução da síntese de antioxidantes e outras proteínas citoprotetoras. Além disso, quando aplicado em músculos intactos, elevou a síntese de antioxidantes (AVNI e cols., 2005). Apesar das evidências apontarem que o uso de laser terapia atenua a resposta inflamatória, os detalhes dos mecanismos moleculares, estruturais e/ou fisiológicos envolvidos nesta modulação ainda necessitam ser esclarecidos.

Ainda, considerando a resposta inflamatória, as moléculas encontradas em tecidos ou fluido articular podem ser consideradas marcadores da doença, e a identificação desses marcadores podem trazer esclarecimentos sobre a sua patogênese, reconhecendo os pacientes em estágios precoces das diferentes patologias inflamatórias. Entretanto, considerando que o uso do laser de baixa intensidade pode promover redução da inflamação por meio da regeneração tecidual (BEM-DOV e cols., 1999),

sugere-se que esta terapêutica altere também a expressão das MMPs. Nesta linha de investigação, estudo recente (NASCIMENTO, 2011), mostrou que a indução da inflamação intraarticular das ATMs bilateral em ratos promove alteração na expressão das MMPs, particularmente das MMP-2 e MMP-9, no gânglio trigeminal em diferentes estágios do desenvolvimento da resposta inflamatória (1, 3, 7 ou 10 dias).

Objetivos

Fundamentado na literatura apresentada, o objetivo deste trabalho será avaliar se o uso de laser terapia de baixa intensidade é capaz de promover alteração na alodinia mecânica e na hiperalgesia orofacial desenvolvida 10 dias após a administração intraarticular de CFA (bilateralmente nas ATMs) de ratos.

Ainda, será avaliado se o uso de laser terapia altera a expressão das gelatinases (MMP-2 e MMP-9) no gânglio trigeminal durante vários estágios do desenvolvimento da inflamação crônica bilateral na ATM (1º, 3º, 7º e 10º após o início dos experimentos).

Desta forma, este trabalho tem como objetivos específicos:

1. Avaliar se o uso de laser terapia de baixa intensidade promove alteração na alodinia mecânica orofacial observada nos dias 1, 3, 5, 7 e 10 dias após pela administração intraarticular de CFA nas ATMs de ratos, utilizando para isto um anestesiomêtro digital, modelo Von Frey.
2. Avaliar se o uso de laser terapia de baixa intensidade altera a hiperalgesia orofacial observada 10 dias após a administração intraarticular de CFA nas ATMs de ratos por meio da realização do teste de formalina orofacial.
3. Verificar se o uso de laser terapia de baixa intensidade promove alterações na expressão das MMP-2 e MMP-9 no gânglio trigeminal, em diferentes estágios do desenvolvimento da inflamação intraarticular (1, 3, 7 e 10 após o início dos experimentos) bilateral das ATMs em ratos utilizando marcação imunohistoquímica e zimografia.

Materiais e Métodos

1. *Animais*

Foram utilizados ratos Wistar machos (200 a 250 gramas, $n = 214$) cedidos pelo Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto. Os ratos foram mantidos, no Biotério I FORP/USP, em caixas acrílicas coletivas (4 ratos por caixa) com 1394 cm^2 de área de piso, em ambiente com temperatura controlada ($24^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$) e ciclo claro-escuro de 12 horas automático (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 a Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento, e foram aprovados pela Comissão de Ética para o Uso de Animais da Prefeitura do *Campus* Administrativo de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (Protocolo número: 11.1.888.53.5).

2. *Indução de inflamação persistente na ATM.*

Para indução de inflamação persistente da articulação temporomandibular, os ratos foram inicialmente anestesiados com uma injeção intramuscular de cloridrato de cetamina a 10 % (75 mg/Kg) associado a xilasina 4% (10 mg/Kg) para permitir a administração de Adjuvante Completo de Freund (CFA) intra-articular. O agente inflamatório, CFA, foi administrado no volume 0,1 mL na região da ATM, bilateralmente. Para a injeção foi utilizada uma agulha calibre 30G $\frac{1}{2}$ 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 (Figura 1). A agulha foi inserida imediatamente inferior à borda póstero-inferior do arco zigomático e avançada em direção anterior até entrar em contato com a borda póstero-lateral do côndilo (ZHOU e cols., 1999). Para controle foi realizada a administração de solução salina 0,9 % (SAL 0,1 mL) bilateralmente, nas ATMs, seguindo mesmo protocolo descrito. Após a administração do CFA ou de SAL 0,9%, foi realizada a primeira sessão de laser terapia de baixa intensidade. Ainda, em um conjunto de animais (CFA ou SAL) não

se realizou a sessão de laser terapia (SHAM). Após o retorno da anestesia, os ratos foram levados ao Biotério I da FORP/USP, onde permaneceram durante todo o período experimental.

Figura 1: Fotografia mostrando o local da aplicação de CFA ou SAL na região da ATM.

Localização da região articular foi realizada de acordo com ZHOU e cols., 1999.

3. *Avaliação da sensibilidade mecânica orofacial.*

Para avaliação da sensibilidade mecânica orofacial, foi mensurado o limiar de retirada da cabeça após a aplicação de um estímulo mecânico não nocivo, por meio do uso de um anestesiomêtro digital modelo Von Frey (Insight Instrumentos, Ribeirão Preto, Brasil), o qual faz uso de um filamento com aumento progressivo de força (em gramas). Este estímulo foi aplicado na região da pele, próximo à s ATM, um dia antes da administração do CFA ou SAL e, nos dias 3, 5, 7 e 10 após a indução da inflamação ou não, em grupos independentes que receberam ou não tratamento com laser de baixa intensidade. O limiar de retirada da cabeça foi avaliado em gramas. Para realização do teste, o rato foi mantido em uma caixa acrílica sem restrição de movimentos por 20 minutos, inicialmente para habituação. Após este período realizou-se o teste com o filamento (Figura 2). Foram realizadas três medidas do limiar em cada sessão (valor em gramas do estímulo que resultou na movimentação da cabeça, ou seja, que caracterizou o reflexo de retirada após a

aplicação do estímulo mecânico), sendo a média destes 3 valores considerado como o limiar de retirada propriamente dito.

Figura 2: Fotografia representativa da avaliação da sensibilidade mecânica orofacial utilizando o anestesiómetro modelo Von Frey.

4. *Avaliação da sensibilidade nociceptiva orofacial.*

Para avaliação da sensibilidade nociceptiva orofacial frente a um estímulo nocivo agudo localizado na região orofacial, foi realizado o teste da formalina orofacial em ratos submetidos à administração de CFA ou SAL 0,9%, intra-articular, bilateralmente, nas ATMs, e submetidos ou não à sessão de laser de baixa intensidade. O teste da formalina orofacial foi realizado 10 dias após o início dos experimentos, ou seja, após a administração de CFA ou SAL 0,9 % intra-articular. Para a realização dos testes os ratos foram habituados à caixa de observação (30 cm x 30 cm x 30 cm em acrílico transparente), por 20 minutos, e em seguida foram levemente anestesiados com halotano para a administração de formalina na concentração de 1,5 % no volume de 50 μ L (CLAVELOU e cols., 1989). A administração foi realizada na região orofacial, unilateralmente, entre o lábio superior e o nariz, na região das vibrissas, tendo como auxílio uma seringa de 1 mL graduada em 0,01 mL e uma agulha 30G½. A administração foi feita o mais rápido possível, para que o animal não fosse manipulado por tempo prolongado. Imediatamente após a administração de formalina 1,5%, e

retorno da anestesia, o rato foi colocado na caixa de observação e iniciou-se a quantificação do comportamento nociceptivo (Figura 3). Como índice de nocicepção foi analisado o tempo gasto pelo rato com o comportamento de coçar a região injetada, em segundos, durante 45 minutos. A análise foi realizada, em 15 blocos de 3 minutos cada. Em tempo, o teste da formalina orofacial é caracterizado por possuir fases distintas, uma fase aguda inicial (0-3 minutos), período silencioso (3-15 minutos) e uma segunda fase (15-45 minutos). É considerado o pico da segunda fase o 7º intervalo do teste, ou seja, o período compreendido entre o 21º e 24º minuto (GRABOW & DOUGHERTY, 2001).

Figura 3: Fotografia representativa de um rato durante a realização do teste de formalina orofacial na caixa de observação.

5. *Tratamento com laser de baixa intensidade.*

As sessões de 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, a região da ATM (bilateralmente) que recebeu a incidência do laser, teve os pelos raspados a fim de que os mesmos não causassem difração dos feixes de luz. 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 (Figura 4). Foi utilizado o laser de baixa

intensidade com comprimento de onda de 780 nm, onde um dos meios ativos do emissor de luz é constituído de gálio-alumínio-arseneto (GaAlAs), com densidade de energia equivalente a 20 J/cm^2 (potência de 40mW, com duração de 20 segundos). Em cada sessão, foi realizada 1 aplicação do laser em cada ATM. Foram realizadas 5 sessões de laser terapia, 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 trabalho anterior, onde foi realizada a quantificação das MMP-2 e MMP-9 nos gânglios da raiz dorsal em modelo experimental de injúria do nervo ciático para desenvolvimento de dor neuropática em ratos (KAWASAKI e cols., 2008).

No grupo controle, os ratos foram submetidos aos mesmos procedimentos para aplicação do laser, porém não foi realizada a aplicação do laser propriamente dita (sessão SHAM).

Figura 4: Fotografia representativa de uma sessão de laser terapia de baixa intensidade na região da articulação temporomandibular em ratos. A aplicação foi realizada bilateralmente com duração de 20 segundos.

6. *Avaliação da presença das gelatinases no gânglio trigeminal.*

A avaliação da presença das gelatinases no gânglio trigeminal foi realizada a técnica da zimografia em gel para quantificação de MMP-2 e MMP-9. Para obtenção do gânglio trigeminal, os ratos foram anestesiados profundamente com a associação de cloridrato de cetamina a 10 % (75 mg/Kg) e xilasina 4 % (10 mg/Kg) e em seguida realizou-se a decapitação. Após este procedimento realizou-se a remoção dos gânglios trigeminais para análise.

Foram realizados grupos independentes de ratos submetidos à administração de CFA ou SAL 0,9% bilateralmente nas ATMs e em seguida submetidos ou não às sessões de laser terapia. Para quantificação das MMPs nos diferentes estágios de desenvolvimento da resposta inflamatória foram avaliados os seguintes tempos de sobrevivência 1, 3, 7 e 10 dias após o início dos experimentos. Para controle da expressão das gelatinases, foi realizado grupo experimental adicional, sem qualquer manipulação (CFA ou SAL intraarticular) e sem tratamento com LLLT.

7. *Remoção do gânglio trigeminal*

Para obtenção do gânglio trigeminal, os ratos foram submetidos à eutanásia por meio de sobredose anestésica com uso de uma solução de hidrato de cloral a 10 % (0,5 ml/100 g de peso corporal), seguida por decapitação, nos períodos de 1, 3, 5, 7 e 10 dias após aplicação de CFA ou SAL na ATM. A determinação destes períodos fundamentou-se em trabalho anterior, onde foi realizada a quantificação das MMP-2 e MMP-9 nos gânglios da raiz dorsal em ratos submetidos a injúria do nervo para desenvolvimento de dor neuropática (KAWASAKI e cols., 2008).

Confirmada a eutanásia, foi realizada a remoção dos gânglios trigeminais, os quais foram dissecados e lavados em solução de NaCl 0,9% com a finalidade de se retirar grande parte do sangue contido na amostra, reduzindo possíveis interferências nos resultados. Todos os tecidos, após a coleta, foram cortados em pedaços para que as amostras fossem utilizadas para extração e quantificação de proteínas. A Figura 5 apresenta uma fotomicrografia de um gânglio trigeminal

obtido em nossos experimentos e corado pela técnica de hematoxilina-eosina, a fim de confirmar a retirada correta do tecido.

Figura 5: Fotomicrografia de corte histológico longitudinal (20 µm de espessura) de um gânglio trigeminal representativo de animal utilizado em nossos experimentos. (Coloração H.E.; aumento de 20x). Barra: 50 µm.

8. *Extrato de gânglio trigeminal.*

Os gânglios trigeminais foram dissecados e lavados em solução salina 0,9% com a finalidade de se retirar grande parte do sangue contido na amostra, reduzindo possíveis interferências nos resultados. Todos os tecidos, após a coleta, foram triturados para que as amostras pudessem ser utilizadas para extração e quantificação de proteínas.

9. *Zimografia*

O zimograma permite visualizar diferentes isoformas de uma enzima ou das formas pró-enzima e enzima ativa, que são muito frequentes em enzimas proteolíticas extracelulares, como as MMPs.

Para o preparo das amostras do gânglio, foi adicionado 150µL do tampão CaCl₂ 10mM, Tris 20mM pH7,4, Fenantrolina 1nM, PMSF 1mM, NEM 1mM) para cada 0,05g do tecido. As amostras foram trituradas com o uso do politron e eram colocadas no gelo, mantidas na geladeira por no mínimo 16 horas para ocorrer o processo de extração das proteínas do tecido. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante retirado foi armazenado em dois tubos tipo eppendorf devidamente rotulados no freezer a -20°C. Um tubo foi utilizado para dosagem de proteínas pelo método de Lowry, necessário para que não houvesse variação da quantidade de proteínas de um animal para outro. O outro tubo foi utilizado para determinar a atividade das metaloproteinases no gel de zimografia.

Foram aplicados 30µg de proteína do extrato do gânglio obtido, 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 a atividade das gelatinases em um extrato favorável a sua atividade pode diminuir ao longo do tempo. O gel utilizado foi feito no laboratório e contém 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. A avaliação da atividade enzimática foi realizada com o uso do software Kodak EDAS290. Após a obtenção dos resultados, o gel foi colocado em uma solução de metanol para contração e seco em papel celofane.

As MMPs foram identificadas por meio de suas massas moleculares, sendo 92 kDa para a MMP-9 e 75 kDa, 72 kDa e 64 kDa para a MMP-2. Após quantificação das bandas através do programa computacional descrito (GeneTools 8.0), o valor do padrão de cada gel foi dividido pelo valor das bandas do mesmo gel e os dados obtidos foram então avaliados estatisticamente.

Este protocolo experimental foi realizado em colaboração com o Laboratório de Histologia da Profa. Dra. Raquel Fernanda Gerlach.

10. Zimografia in situ

Esta análise foi realizada para verificar o total de atividade gelatinolítica nos tecidos dos grupos de animais deste estudo. Os gânglios foram congelados em TissueTek O.C.T. Compound e isopentano e acondicionados em freezer à -70°C. Foram feitos cortes longitudinais de 10µm de espessura em criostato e estes cortes foram dispostos em lâminas tratadas com poli-L-Lisina (P8920, Sigma, St. Louis, MO, USA).

Os cortes foram cobertos por substrato DQ-gelatin (E12055, Molecular Probes, Oregon, USA) diluído na concentração de 1:10 em Tris-CaCl₂ (50mol, pH 7,4). Foram aplicados 20 µL da DQ-gelatin em cada corte. As lâminas foram incubadas no interior de uma câmara úmida, escura e a temperatura ambiente por 1 hora. Após a incubação, as lâminas foram lavadas 3 vezes com PBS e em seguida os cortes foram fixados com paraformaldeído a 4% tamponado (PFA) por 10 minutos. Houve então nova lavagem, e as lâminas foram montadas com lamínulas para serem visualizadas e fotografadas. Para a quantificação da atividade gelatinolítica foi utilizado o programa LeicaQwin (LeicaImaging Systems Ltda, Cambridge, Inglaterra) em conjunto com um microscópio Leica (Leica DMR), vídeocâmera (Leica DC300F) e um microcomputador. A quantificação da fluorescência foi realizada em pixels por área.

Este protocolo experimental foi realizado em colaboração com o Laboratório de Histologia da Profa. Dra. Raquel Fernanda Gerlach.

11.Drogas

Neste estudo foi utilizado o Adjuvante Completo de Freund no volume de 50µl para promover a inflamação persistente das ATMs em ratos. Para administração de CFA ou SAL intraarticular os ratos foram anestesiados com a associação de cloridrato de cetamina a 10% (75mg/Kg) com xilasina 4% (10mg/Kg) via intramuscular.

Para o teste de sensibilidade orofacial, utilizou-se formalina 1,5 %, no volume de 50 µL, e halotano, anestésico inalatório e volátil.

Na eutanásia, utilizou-se o hidrato de cloral 10 % (0,5 ml/100g) para anestesia profunda, seguida ou não (Protocolos 1 e 2) de decapitação (Protocolo 3).

12.Eutanásia

Após o término dos experimentos dos protocolos 1 e 2 os ratos foram submetidos à eutanásia por meio de sobredose anestésica com a utilização hidrato de cloral a 10 % (0,5 ml/100g peso corporal). Após confirmação da morte do animal (parada cardiorrespiratória por pelo menos 10 minutos e ausência de sensibilidade cutânea) os mesmos foram enviados para coleta biológica seletiva.

13.Análise dos Resultados

Na avaliação da sensibilidade mecânica orofacial foi avaliada a média $\pm$ erro padrão da média do limiar de retirada da cabeça, em gramas, antes e após a administração de CFA ou SAL bilateral nas ATMs (em diferentes dias experimentais). Para análise estatística foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de duas vias com medidas repetidas, seguida pelo teste de Newman-Keuls, considerando para significância $P < 0,05$. Na avaliação da sensibilidade nociceptiva orofacial foi considerada a média do tempo, em segundos, da emissão do comportamento de coçar a região

orofacial ipsilateral à injeção de formalina 1,5% $\pm$ erro padrão da média, em intervalos de 3 minutos. Para análise estatística foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida pelo teste de Newman-Keuls, considerando para significância $P < 0,05$.

Para avaliação da expressão das MMPs foi utilizado o programa GeneTools 8.0 e realizada a quantificação por meio de unidades arbitrárias $\pm$ erro padrão da média para cada MMP, ou seja, MMP-2 e MMP-9, em cada período de sobrevida avaliado. A análise estatística foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA) de duas vias (onde as variáveis foram SAL ou CFA, e SHAM ou LASER). Quando possível, foi realizado o teste *post hoc* de Newman-Keuls, considerando para significância $P < 0,05$.

14. Protocolos experimentais

Protocolo 1: Avaliação da sensibilidade mecânica orofacial em ratos submetidos à administração de CFA intraarticular nas ATMs e tratados com laser de baixa intensidade.

Grupo 1 (n = 6, MEC: SAL+SHAM): ratos foram submetidos a teste de sensibilidade mecânica orofacial previamente a injeção de solução salina 0,9 % na região das ATMs bilateralmente, e foram submetidos às sessões SHAM de laser terapia, conforme protocolo descrito, e no 3º, 5º, 7º e 10º dia experimental foi realizado o teste de avaliação da sensibilidade mecânica orofacial.

Grupo 2 (n = 6, MEC: SAL+LASER): ratos foram submetidos a teste de sensibilidade mecânica orofacial previamente a injeção de solução salina 0,9 % na região das ATMs bilateralmente, e foram submetidos às sessões de laser terapia, conforme protocolo descrito, e no 3º, 5º, 7º e 10º dia experimental foi realizado o teste de avaliação da sensibilidade mecânica orofacial.

Grupo 3 (n = 6, MEC: CFA+SHAM): ratos foram submetidos a teste de sensibilidade mecânica orofacial previamente a injeção de CFA na região das ATMs, bilateralmente, e foram

submetidos às sessões SHAM de laser terapia, conforme protocolo descrito, e no 3º, 5º, 7º e 10º dia experimental foi realizado o teste de avaliação da sensibilidade mecânica orofacial.

Grupo 4 (n = 6, MEC: CFA+LASER): ratos foram submetidos a teste de sensibilidade mecânica orofacial previamente a injeção de CFA na região das ATMs, bilateralmente, e foram submetidos às sessões de laser terapia, conforme protocolo descrito, e no 3º, 5º, 7º e 10º dia experimental foi realizado o teste de avaliação da sensibilidade mecânica orofacial.

Protocolo 2: Avaliação da sensibilidade nociceptiva orofacial em ratos submetidos à administração de CFA intraarticular nas ATMs e tratados com laser de baixa intensidade.

Grupo 1 (n = 6, FOR: SAL+SHAM): ratos receberam injeção de solução salina 0,9 % na região das ATMs bilateralmente, e foram submetidos às sessões SHAM de laser terapia, conforme protocolo descrito, e no 10º dia experimental foi realizado o teste de avaliação da sensibilidade nociceptiva orofacial, pelo teste da formalina.

Grupo 2 (n = 6, FOR: SAL+LASER): ratos receberam injeção de solução salina 0,9 % na região das ATMs bilateralmente, e foi submetidos às sessões de laser terapia, conforme protocolo descrito, e no 10º dia experimental foi realizado o teste de avaliação da sensibilidade nociceptiva orofacial, pelo teste da formalina.

Grupo 3 (n = 6, FOR: CFA+SHAM): ratos receberam injeção de CFA na região das ATMs, bilateralmente, e foram submetidos às sessões SHAM de laser terapia, conforme protocolo descrito, e no 10º dia experimental foi realizado o teste de avaliação da sensibilidade nociceptiva orofacial, pelo teste da formalina.

Grupo 4 (n = 6, FOR: CFA+LASER): ratos receberam injeção de CFA na região das ATMs, bilateralmente, e foram submetidos às sessões de laser terapia, conforme protocolo descrito, e no 10º

dia experimental foi realizado o teste de avaliação da sensibilidade nociceptiva orofacial, pelo teste da formalina.

Protocolo 3: Quantificação das gelatinases MMP-2 e MMP-9 em ratos submetidos à inflamação persistente bilateral na ATM e submetidos à laser terapia de baixa intensidade.

Grupo 1 (n = 6 para cada período de sobrevida, MMP: CONTROLE): ratos deste grupo foram anestesiados para simples manipulação e após o término do tempo de sobrevida de 1, 3, 5, 7 ou 10 dias, os animais foram submetidos à eutanásia para remoção dos gânglios trigeminais. Este grupo experimental teve como objetivo quantificar a MMP basal do gânglio trigeminal de ratos sem tratamento algum.

Grupo 2 (n = 6, para cada período de sobrevida, MMP: SAL+SHAM): ratos destes grupos receberam a injeção de solução salina 0,9 % na região das ATMs e foram submetidos às sessões SHAM de laser terapia conforme protocolo descrito em item anterior. Após o término do tempo de sobrevida, 1, 3, 7 ou 10 dias, os ratos foram submetidos à eutanásia para remoção dos gânglios trigeminais.

Grupo 3 (n = 6, para cada período de sobrevida, MMP: SAL+LASER): ratos destes grupos receberão a injeção de solução salina 0,9 % na região das ATMs e foram submetidos às sessões de laser terapia conforme protocolo descrito em item anterior. Após o término do tempo de sobrevida, ou seja, 1, 3, 7 ou 10 dias, os ratos foram submetidos à eutanásia para remoção dos gânglios trigeminais.

Grupo 4 (n = 6, para cada período de sobrevida, MMP: CFA+SHAM): ratos destes grupos receberam a injeção de Adjuvante de Freund (CFA) na região das ATMs e foram submetidos às sessões SHAM de laser terapia conforme protocolo descrito em item anterior. Após o término do

tempo de sobrevida, 1, 3, 7 ou 10 dias, os ratos foram submetidos à eutanásia para remoção dos gânglios trigeminais.

Grupo 5 (n = 6, para cada período de sobrevida, MMP: CFA+LASER): ratos destes grupos receberam a injeção de Adjuvante de Freund (CFA) na região das ATMs e foram submetidos às sessões SHAM de laser terapia conforme protocolo descrito em item anterior. Após o término do tempo de sobrevida, 1, 3, 7 ou 10 dias, os ratos foram submetidos à eutanásia para remoção dos gânglios trigeminais.

Resultados

Protocolo 1: Avaliação da sensibilidade mecânica orofacial em ratos submetidos à administração de CFA intraarticular nas ATMs e tratados com laser de baixa intensidade.

Nossos resultados mostram que a administração de CFA bilateral nas ATMs em ratos é capaz de promover alteração da sensibilidade mecânica orofacial, avaliada pelo teste de von Frey ao longo do desenvolvimento da inflamação intra-articular. Em adição, no grupo CFA+LASER, a sensibilidade mecânica orofacial, mostrou-se alterada nos dias 3 e 5 após o início dos experimentos, porém, a partir do 7º dia experimental, o limiar de retirada de cabeça (em gramas) não foi diferente do limiar basal deste mesmo grupo, nem dos grupos que receberam administração intraarticular de SAL (Figura 6)

A análise estatística realizada (TWO WAY ANOVA) aponta que há diferenças significativas considerando o fator tratamento ($F_{3,119} = 10,426$, $p < 0,001$), tempo ($F_{4,119} = 6,032$, $p < 0,001$), além de evidenciar interação entre tempo e tratamento ($F_{12,119} = 3,490$, $p < 0,001$). A aplicação do pós-teste de Newman-Keuls mostra, em particular, que no grupo CFA+SHAM (sem laserterapia), ocorreu redução do limiar de retirada de cabeça frente à estímulo mecânico inócuo ($p < 0,05$) quando comparado a seu respectivo limiar basal ($64,9 \pm 2,3$ g), aos períodos de 3 dias ($47,4 \pm 2,7$ g), 5 dias ($44,2 \pm 3,3$ g), 7 dias ($49,4 \pm 4,0$ g) e 10 dias ($39,4 \pm 3,4$ g). Entretanto, no grupo CFA+LASER, a análise estatística revelou diferença significativa ($p < 0,05$, Newman-Keuls) entre o limiar de retirada nos dias 3 ($43,9 \pm 4,5$ g) e 5 dias ($48,8 \pm 3,6$ g) quando comparados com o limiar de retirada no período basal ($63,1 \pm 2,4$ g), e 7 ($68,9 \pm 3,3$ g) e 10 ($66,1 \pm 5,7$ g) dias após o início da inflamação intraarticular (Figura 6).

Nos grupos que receberam solução salina na região das ATMs, e que foram tratados ou não com LLLT (SAL+SHAM, SAL+LASER), não se observou diferença estatisticamente significativa entre os limiares de retirada no teste de Von Frey nos diferentes períodos experimentais (Figura 6).

Figura 6: Sensibilidade Mecânica Orofacial. Limiar de retirada da face após a aplicação de estímulo mecânico graduado (teste de Von Frey) antes (Basal) ou em diferentes dias após o tratamento (3, 5, 7, e 10 dias) em ratos submetidos à administração de solução salina (SAL) ou Adjuvante Completo de Freund (CFA) intraarticular, e que receberam (LASER) ou não laser de baixa intensidade. (a) $P < 0,05$, teste de Newman-Keuls, quando comparado com seu respectivo limiar de retirada no período BASAL (b) $P < 0,05$ teste de Newman-Keuls quando comparado aos grupos SAL e SAL+LASER dentro do mesmo período. (c) $P < 0,05$, quando CFA é diferente dos demais grupos dentro do mesmo período.

Protocolo 2: Avaliação da sensibilidade nociceptiva orofacial em ratos submetidos à administração de CFA intraarticular nas ATMs e tratados com laser de baixa intensidade.

Os dados obtidos neste trabalho mostram que a inflamação persistente induzida pela administração intraarticular bilateral de CFA nas ATMs de ratos promoveu aumento do índice nociceptivo avaliado no teste de formalina orofacial (Figura 7). Ainda, a laserterapia foi capaz de reduzir o aumento dos comportamentos nociceptivos observados após a administração de formalina orofacial (Figura 7).

A aplicação da TWO-WAY ANOVA evidenciou diferença no tratamento ($F_{3,359} = 49,031$, $p < 0,001$) no tempo ($F_{14,359} = 14,673$, $p < 0,001$) bem como interação entre tempo e tratamento ($F_{42,359} = 3,999$, $p < 0,001$). Em particular, o teste post-hoc de Newman-Keuls ($p < 0,05$) apontou diferença entre o grupo CFA+SHAM quando comparado aos demais grupos experimentais (CFA+LASER, SAL+LASER e SAL+SHAM, Figura 7) na fase 2 do teste de formalina, exceto no período de 30 a 33 e 39 minutos do teste. Entretanto, não houve diferenças no tempo de coceira entre os diferentes grupos na fase 1 da formalina orofacial (tempo de 0 – 3 min.).

Figura 7: Sensibilidade Nociceptiva Orofacial. Resposta de coceira da face após a aplicação de formalina 1,5 % orofacial, 10 dias após a administração intraarticular Salina ou CFA e que receberam ou não tratamento com laser de baixa intensidade. Em (a) $P < 0,05$ teste de Newman-Keuls quando comparado ao grupo SAL e SAL+LASER, (b) $P < 0,05$ teste de Newman-Keuls quando comparado com ao CFA+LASER.

Protocolo 3: Quantificação das gelatinases MMP-2 e MMP-9 em ratos submetidos à inflamação persistente bilateral na ATM e submetidos à laser terapia de baixa intensidade.

Os resultados do presente trabalho mostram que a administração de CFA intraarticular nas ATMs bilateralmente promoveu aumento da expressão de MMP-2 (64 kDa, 72 kDa e 75kDa) 1 dia após o início dos experimentos e mantendo-se alta em todos os períodos avaliados. Com destaque, a maior quantidade de MMP-2 no gânglio trigeminal foi encontrada 10 dias após o início dos experimentos (Figuras 10). Para a MMP-9, observa-se aumento expressivo, no grupo CFA+SHAM no gânglio trigeminal 1, 3, 5 e 7 dias do experimento. Em contrapartida, no período de 10 dias, não se observa alteração da MMP-9 induzida pelo CFA (Figura 9). Adicionalmente, o tratamento com laser de baixa intensidade (grupo CFA+LASER) apresentou expressão de MMP-2 (64 kDa, 72 kDa e 75 kDa) e MMP-9 semelhante aos grupos controles (Controle, SAL, SAL+LASER), mostrando que a laserterapia bloqueou o aumento da expressão das gelatinases no gânglio trigeminal induzida pelo CFA administrado bilateralmente nas ATMs de ratos (Figuras 9 e 10).

A aplicação da análise estatística (TWO-WAY ANOVA) evidenciou que a expressão de MMP-9 (95 kDa) teve diferença quanto ao tempo ($F_{4,149}=10,430$, $p<0,001$), ao tratamento ($F_{4,149}=10,058$, $p<0,001$), bem como, interação tempo e tratamento ($F_{16,149}=2,086$, $p<0,05$). O teste *post-hoc* de *Newman-Keuls* apontou diferença o grupo CFA+SHAM quando comparado com os grupos Controle, SAL, SAL+LASER e CFA+LASER ($P < 0,001$). Em particular, encontrou-se diferença significativa nos períodos de 1, 5 e 7 dias da expressão da MMP-9 no gânglio trigeminal do grupo CFA+SHAM comparado com os grupos Controle, SAL, SAL+LASER e CFA+LASER. Adicionalmente, houve diferença estatística entre o grupo CFA+LASER, no período de 5 dias comparado com os grupos Controle, SAL+SHAM e SAL+LASER ($p < 0,05$, Figura 9).

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 ($P < 0,05$) diferença estatística quanto ao tempo ($F_{4,149}=44,790$, $P < 0,001$), ao tratamento ($F_{4,149}=14,250$, $P < 0,001$), e não foi observada interação entre tempo – tratamento. O teste *post hoc* de Newman-Keuls mostrou diferença na expressão de MMP2 (75 kDa) do grupo CFA+SHAM no período de 3 e 10 dias quando comparado aos grupos Controle, SAL+SHAM e SAL+LASER e CFA+LASER (Figura 10).

Para a MMP-2 (72 kDa), observa-se diferença estatística (TWO-WAY ANOVA) considerando o fator tempo ($F_{4,149}=17,635$, $P < 0,001$), tratamento ($F_{4,149}=13,867$, $P < 0,001$) e não se observou interação tempo - tratamento. Em particular, a expressão da MMP-2 (72 kDa) no gânglio trigeminal no grupo CFA+SHAM foi diferente significativamente ($P < 0,05$, Newman-Keuls) quando comparado aos grupos Controle, SAL+SHAM e SAL+LASER e CFA+LASER nos períodos 1 e 10 dias. Ainda, no período de 3 dias o grupo CFA+SHAM diferiu do grupo Controle e SAL+SHAM ($P < 0,05$, Newman-Keuls). Adicionalmente, o grupo CFA+LASER não apresentou diferença quanto a expressão de MMP-2 (72 kDa) comparado aos grupos Controle, SAL+SHAM, SAL+LASER (Figura 10)

Ainda, para a MMP-2 (64 kDa) a aplicação TWO-WAY ANOVA apontou diferença estatística quanto ao tempo ($F_{4,148}=31,412$, $P < 0,001$), ao tratamento ($F_{4,148}=25,709$, $P < 0,001$), e observa-se interação entre tempo–tratamento ($F_{4,148}=3,316$, $p < 0,001$). O teste de Newman-Keuls evidencia que a expressão de MMP-2 (64 kDa) no gânglio trigeminal do grupo CFA+SHAM foi diferente significativamente ($P < 0,05$) quando comparado os grupos Controle, SAL+SHAM, SAL+LASER e CFA+LASER nos períodos de 5, 7 e 10 dias. No mais, no período de 3 dias o grupo CFA+SHAM diferiu do grupo Controle, SAL+SHAM ($P < 0,05$, Newman-Keuls). Adicionalmente, o grupo CFA+LASER não apresentou diferença quanto a expressão de MMP-2 (72 kDa) comparado aos grupos Controle, SAL+SHAM, SAL+LASER ($P < 0,05$, Newman-Keuls) (Figura 10).

Figura 8: Fotografia de zimogramas representativos de gânglio trigeminal de ratos. Amostras de gânglio 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. Na figura está apresentada a expressão de MMP-9 (92KDa) e MMP-2 (75 kDa, 72 kDa e 64 kDa). O Controle representa expressão das gelatinases em rato sem manipulação intraarticular (CFA ou SAL) e sem LLLT.

Figura 9: Avaliação quantitativa da expressão de gelatinases MMP-9 (unidades arbitrárias) em gânglios trigeminiais em diferentes períodos experimentais. Média $\pm$ EPM da expressão de MMP-9 nos grupos submetidos à administração de solução salina 0,9 % (SAL) ou Adjuvante Completo de Freund (CFA) bilateral na ATM, ou sem manipulação intraarticular (Controle) com tempo de sobrevida de 1, 3, 5, 7 ou 10 dias. Em (a) quando diferente do seu respectivo 1º dia ($p < 0,05$, Newman-Keuls). Em (b) quando comparado ao respectivo 5º dia ($p < 0,05$, Newman-Keuls). Em c quando comparado ao respectivo valor do 7º dia experimental. Em (*) quando o grupo CFA é diferente dos demais grupos no mesmo período ($p < 0,05$, Newman-Keuls). E em (#) quando CFA+LASER é diferente dos demais grupos no período de 5 dias.

Figura 10: Avaliação quantitativa da expressão de gelatinases MMP-2 (75 kDa, 72 kDa e 64 kDa) (unidades arbitrárias) em gânglios trigeminais em diferentes períodos experimentais. Média $\pm$ EPM da expressão de MMP-2 (75kDa, 72kDa e 64kDa) nos grupos submetidos à administração de solução salina 0,9 % (SAL) ou Adjuvante Completo de Freund (CFA) bilateral na ATM, ou sem manipulação intraarticular (Controle), com tempo de sobrevida de 1, 3, 5, 7 ou 10 dias. Em (a) quando CFA é diferente dos demais grupos no mesmo período ($p < 0,001$, Newman-Keuls). Em (b) quando comparado ao grupo CFA+LASER no mesmo período ($p < 0,05$, Newman-Keuls). Em (*) ($p < 0,05$, Newman-Keuls), quando comparado aos valores do respectivo 1º dia $\pm$ erro padrão da média. Em (*) quando diferente dos demais períodos dentro do mesmo grupo ($p < 0,05$, Newman-Keuls).

A análise estatística TWO WAY ANOVA para atividade gelatinolítica das MMP-2 e MMP-9 em gânglio trigeminal de ratos evidenciou que a aplicação de CFA intraarticular mostrou diferença estatisticamente significativa no tratamento ($F_{4,124} = 718,122$, $p < 0,001$), e interação entre tempo e tratamento ($F_{16,124}=4,009$, $p < 0,001$), porém não mostrou diferença significativa no tempo. O grupo CFA+SHAM apontou diferença quando comparado aos grupos Controle, SAL+SHAM, SAL+LASER, CFA+LASER ($p < 0,05$, Newman-Keuls, Figura 12). Ainda o teste *post hoc* de Newman-Keuls mostrou diferença dentro do grupo CFA+SHAM entre os períodos 1, 3, 5 e 10 quando comparado com o respectivo 7º dia de experimentação, bem como entre o 1º e 9º dia de experimentação quando comparados aos respectivos 3º e 5º período ($p < 0,05$, Newman-Keuls, Figura 12).

Em contrapartida, os grupos CFA+LASER, SALINA+LASER, SALINA+SHAM e Controle não mostram diferença estatisticamente significativa entre os eles nos diferentes períodos (Figura 12).

A figura 11 mostra uma fotomicrografia representativa de cortes longitudinais da região do gânglio trigeminal, evidenciando a atividade gelatinolítica das MMPs nos diferentes períodos experimentais.

Figura 11: Fotomicrografias representativas de cortes longitudinais (10 μ m) do tronco encefálico de ratos, na região do gânglio trigeminal, evidenciando a atividade gelatinolítica das MMPs no 1º dia ou 3º, 5º, 7º e 10º dias após a administração de Adjuvante Completo de Freund (CFA), ou solução salina 0,9 % (SAL), ou sem qualquer manipulação intraarticular (Controle), em ratos submetidos (LASER) ou não a laserterapia. (Fluorescência verde, aumento de 10X).

Figura 12: Atividade gelatinolítica de metaloroteínas da matriz extracelular. Amostras de gânglio trigeminal de ratos submetidos à aplicação intraarticular, bilateralmente, de Adjuvante Completo de Freund (CFA) ou solução salina 0,9% (SAL), ou então sem qualquer manipulação intraarticular (Controle) e tratados com LLLT (LASER) ou não, após o tempo de sobrevivência de 1, 3, 5, 7 e 10 dias. Em (a) quando CFA é diferente dos demais grupos dentro do mesmo período. Em (*) quando o grupo CFA for diferente dos demais períodos dentro do mesmo grupo ($p < 0,001$, Newman-Keuls).

Díscussão

Os resultados do presente trabalho corroboram achados anteriores evidenciando que a inflamação bilateral das ATMs em ratos induzida por CFA promove alodinia mecânica, hiperalgesia, bem como aumenta a expressão das gelatinases MMP-9 e MMP-2 no gânglio trigeminal. Em adição, os dados apontam que o tratamento com laser de baixa intensidade (LLLT) é capaz de reduzir a alodinia mecânica e a hiperalgesia orofacial, e ainda reduzir o aumento da expressão da MMP-9 (fases iniciais do desenvolvimento da inflamação articular) e da MMP-2 (fase inflamatória duradoura) no gânglio trigeminal. Em particular, os resultados mostram que a partir do 5º dia de tratamento há melhora significativa da alodinia mecânica, bem como ocorre redução da expressão da MMP-9 no gânglio trigeminal do grupo CFA+LASER. Nossos resultados apontam ainda que na ausência da resposta inflamatória, a laser terapia não altera a sensibilidade mecânica (teste de von Frey), a hiperalgesia (teste da formalina orofacial), nem a expressão das gelatinases (MMP-9 e MMP-2) no gânglio trigeminal, reforçando a hipótese de que a LLLT atua reduzindo a resposta inflamatória induzida pela administração bilateral de CFA (Figuras 9 e 10).

Corroborando nossos achados, trabalho clínico de KULEKCIOGLU e cols. (2003) mostrou que o tratamento por 15 dias com LLLT de pacientes portadores de DTM de origem mio gênica ou artrogênica foi eficaz na redução da sintomatologia dolorosa e dos ruídos articulares, na melhora na abertura bucal bem como no movimento de lateralidade mandibular. De fato, o uso da LLLT promove distintos efeitos biológicos, dentre eles estimulação da proliferação celular, aumento da síntese de colágeno e da secreção de fatores de crescimento, melhora da circulação sanguínea, aceleração do processo de epitelização (REDDY, 2004). Assim, é possível que devido à ação biológica tecidual de laser terapia, ocorra redução da resposta inflamatória local, melhora do reparo tecidual e consequentemente, redução da sintomatologia dolorosa e melhora das condições musculares e articulares dos pacientes portadores de DTM.

Utilizando modelo de degeneração muscular induzida por miotoxina na região do músculo da tíbia em camundongos, AMARAL e cols. (2001) mostraram que o uso de laser de HeNe em doses

crescentes (2,6, 8,4 ou 25 J/cm²) promoveu maior proliferação de fibras musculares e da população mitocondrial, com melhor regeneração muscular. Em particular, a dose de 2,6 J/cm² foi a mais efetiva em promover o aumento da densidade mitocondrial e das fibras musculares comparada aos grupos sem laser terapia.

O uso clínico da LLLT para o tratamento de doenças inflamatórias tem sido amplamente utilizado desde 1981 (GOLDMAN, 1981). Entretanto, os mecanismos da irradiação com laser ainda não foram totalmente esclarecidos. É possível que a LLLT possua efeitos antiinflamatórios, desde que alguns achados mostraram que a laser terapia promoveu alterações nos níveis de prostaglandinas E₂ e de interleucina 1 β (IL-1 β) tanto *in vitro* (SHIMIZU e cols., 1995, SAKURAI e cols., 2000) como *in vivo* (ALBERTINI e cols., 2004, CAMPANA e cols., 2003), e redução da formação de edema. Especificamente, a irradiação com laser GaAlAs em cultura de células de ligamentos periodontais humanos reduziu significativamente a produção de PGE₂ e IL-1 β observada 3 e 5 dias após a aplicação de força controlada (semelhante à tensão promovida pela movimentação ortodôntica em incisivos) (SHIMIZU e cols., 1995). Dentro desta mesma perspectiva, SAKURAI e cols. (2000) mostrou que a laser terapia em cultura de fibroblastos gengivais humanos reduziu a produção de PGE₂ bem como da enzima ciclooxigenase 2 induzida pela incubação durante 8 horas com lipopolissacarídeo (LPS). Em contrapartida, estudo de ALBERTINI e cols. (2004) mostrou que o tratamento agudo com laser GaAlAs (2,5 J/cm², 80s a cada hora por 4 horas) reduziu o edema plantar em ratos induzido pela administração de carragenina de forma semelhante à administração de um antiinflamatório inibidor da ciclooxigenase (diclofenaco sódico). Ainda, em ratos adrenalectomizados, o uso de laser terapia não reduz o edema plantar sugerindo, que a ação antiinflamatória do laser GaAlAs, neste modelo experimental pode ser via liberação de hormônios corticosteroides da medula da adrenal (ALBERTINI e cols., 2004). Juntos, estes estudos corroboram os nossos achados onde observamos redução da alodinia mecânica e da hiperalgesia em ratos, possivelmente, devido a redução de mediadores inflamatórios intraarticular. Em tempo, observamos

que a LLLT reduziu significativamente a expressão de MMP-9 e MMP-2 no gânglio trigeminal induzida pela inflamação intraarticular devido à administração de CFA nas ATMs bilateral. De fato, a injeção de CFA intraarticular elevou os níveis de IL-1 β no fluido sinovial, atingindo o pico de concentração com a administração de 50 μ g de CFA (HARPER e cols., 2001), bem como promoveu comportamentos nociceptivos, como a coceira da região orofacial, e comportamentos recuperativos e de atenção com a superfície corporal (MACFARLAND e cols., 1987).

A disfunção temporomandibular (DTM), possui aspecto multifatorial, sendo o componente inflamatório a principal causa de sintomatologia dolorosa. De fato, a inflamação periférica é a maior causa de dores crônicas e persistentes (WATKINS e MAIER, 2002). Ainda, modificações nos neurônios sensoriais induzidas pela inflamação têm sido amplamente estudadas por diversos pesquisadores.

Considerando as vias neurais sensoriais, os neurônios sensoriais ganglionares ocupam posição única nestas vias ascendentes representando a primeira estação do sistema nervoso onde as sensações são geradas, em particular, a sensibilidade dolorosa. Em adição, há crescentes evidências de que as células ganglionares podem contribuir para o estabelecimento dos quadros de dores crônicas e persistentes (TSUDA e cols., 2003, 2005; WATKINS & MAIER, 2002), entre elas as células gliais satélites (CGSs) tem recebido destaque nos últimos anos (DUBLIN & HANANI, 2007; BERTA e cols. 2012). Estas CGSs atuam como barreira mecânica para neurônios do gânglio da raiz dorsal e do gânglio trigeminal (HANANI, 2005), além de participar de mecanismos de recaptação de neurotransmissores e podem exercer um fino controle do microambiente neuronal (KEAST & ANDERSON, 2000; BRAUN e cols., 2004). Diferentes evidências tem mostrado que as CGSs estão envolvidas nas modificações morfológicas e bioquímicas que ocorrem após a injúria neural periférica e a inflamação (XIE e cols., 2009; DUBLIN & HANANI, 2007; DUBOVY e cols., 2010). Em tempo, no tecido neural, há grande expressão de MMP-9, incluindo nos neurônios, nas células gliais, tais como os astrócitos e na micróglia (GOTTSCHALL & DEB, 1996; CANDELARIO-JALIL e

cols, 2009). Ainda, enquanto a MMP-2 é considerada uma gelatinase constitutiva, a MMP-9 é altamente induzível e de expressão transiente, sendo um dos principais estímulos para sua expressão, estímulos inflamatórios, tais como as citocinas inflamatórias (JI e cols., 2009). A gelatinase MMP-9 tem como principal função fisiológica no tecido neural a plasticidade sináptica, além de estar correlacionada com o desenvolvimento e a regeneração tecidual, tal como a MMP-2 (YOUNG, 2005; WILCZYNSKI e cols., 2008). É importante ressaltar que as MMPs produzidas pelas células ganglionares, devido à estímulos diversos, tais como um processo inflamatório, podem ser transportadas do soma neuronal para a periferia promovendo seus efeitos tanto na região ganglionar, quanto perifericamente (JI e cols., 2009).

Considerando a sensibilidade nociceptiva, em particular em modelo de dor neuropática, ou persistente, trabalho de KAWASAKI e cols. (2008) mostrou que as gelatinases MMP-2 e MMP-9 participam diferentemente do desenvolvimento do quadro de dor neuropática. Neste estudo, a injúria periférica neural, induzida por ligadura do nervo espinal na região de L5 promoveu aumento da expressão de MMP-9 no gânglio da raiz dorsal 1 dia após o início dos experimentos, sendo este aumento transiente, ou seja, não observado em outros estágios do estabelecimento da dor neuropática. Em contrapartida, o aumento da atividade da MMP-2 ganglionar ocorreu de forma mais tardia, no 7º dia experimental, mantendo-se alta até o término do período de experimentação (21 dias). Estes achados corroboram os nossos resultados onde observamos aumento da expressão de MMP-9 no gânglio trigeminal imediatamente após o início da inflamação induzida por CFA nas ATMs, enquanto que o aumento da MMP-2 (72 kDa) foi observado em grande quantidade no 10º dia experimental.

De fato, a MMP-9 e MMP-2 possuem importante envolvimento na dor neuropática e persistente, sendo responsáveis pela ativação da IL-1 β nas fases iniciais (MMP-9) e na manutenção da dor persistente (MMP-2), (PARKS e cols. 2004; KAWASAKI e cols., 2008). A ação das gelatinases, com destaque para a MMP-9 no estabelecimento da dor persistente ocorre em grande

parte pela ativação da IL-1 β (PARKS e cols., 2004; HAZUDA e cols., 1990, em LIU e cols., 2012), bem como de outras moléculas bioativas tais como o fator de necrose tumoral (TNF- α) (SCHONBECK e cols., 1998; CAUWE e cols., 2007) e pro-neurotrofinas tais como pro-NGF e pro-BDNF (SCHONBECK e cols., 1998; LEE e cols., 2001). Entretanto, há também indução da proliferação e remodelação de CGSs (CHATTOPADHYAY e SHUBAYEV, 2009). Estudos têm apontado que em modelos de dor crônica ou persistente a comunicação entre as CGSs e os neurônios sensoriais ganglionares está grandemente aumentada, por facilitação das junções gap entre as células (HANANI e cols., 2002; DUBLIN e HANANI, 2007) e devido a aumento das correntes de sódio e supressão de correntes de potássio (BINSHTOK e cols., 2008). Assim, evidências tem mostrado que a MMP-9 promove ativação da IL-1 β levando a uma hiperexcitabilidade dos neurônios sensoriais primários (BERTA e cols., 2012, DUBLIN e HANANI, 2007). Este efeito pode ser correlacionado com a hiperalgesia observada em quadros inflamatórios (LIU e cols., 2002, SPATARO e cols., 2004 em DUBLIN & HANANI, 2007). Trabalho recente de Berta e cols. (2012) mostrou que o bloqueio da MMP-9 abole a ativação das CGSs, bem como a expressão da IL-1 β .

Em tempo, a presença de MMPs tem sido considerada um marcador inflamatório, como em casos de osteoartrite (TANAKA, 2001). Em particular, durante o processo inflamatório articular ocorre aumento tanto de marcadores conhecidos, tais como IL-1 β e IL-6, como também o aumento das MMP-2 e MMP-9 no líquido sinovial (KUBOTA e cols., 1998). Adicionalmente, verificou-se, no líquido sinovial, a presença de collagenases tipo MMP-1, MMP-8 e MMP-13 (SRINIVAS e cols., 2001). Em adição, as MMPs podem participar dos processos patológicos nociceptivos alterando a mielinização dos nervos periféricos (CHATTOPADHYAY e cols., 2007). Especificamente, foi mostrado que em camundongos *knockout* para MMP-9 a remielinização que ocorre após a injúria experimental do nervo ciático é mais efetiva e há redução dos comportamentos nociceptivos quando comparados com camundongos controle. Estes dados sugerem que a MMP-9 associada às citocinas inflamatórias está correlacionada com as alterações dos nervos periféricos associadas à injúria.

Em resumo, é possível hipotetizar que a inflamação persistente promovida pela administração de CFA intraarticular bilateral nas ATMs em ratos, no presente trabalho induziu aumento da expressão de MMP-9 e MMP-2, e estas por sua vez promoveram aumento das citocinas e remodelação das CGSs no gânglio trigeminal, contribuindo para a alodinia mecânica e a hiperalgesia. Além disso, a LLLT reduziu as alterações na sensibilidade mecânica e nociceptiva, devido a suas ações antiinflamatórias reduzindo a expressão das gelatinases MMP-9 e MMP-2 ganglionares, sugerindo redução da atividade das citocinas (IL-1 β) e minimizando as alterações nas CGSs. É importante ressaltar que o uso de inibidores das metaloproteinases, em particular das gelatinases, para o tratamento de processos inflamatórios tem sido realizado em alguns casos, tais como na artrite, na aterosclerose, na periodontite e no câncer (HU e cols., 2007). De fato, estudo de TALHOUK e cols. (2000) evidencia que a administração de inibidores das gelatinases reduz a hiperalgesia plantar (avaliada no teste de placa quente e de pressão mecânica) induzida por endotoxina de forma semelhante ao tratamento com morfina (2 mg/Kg, i.p.). Entretanto, ainda se faz necessário o esclarecimento em detalhes dos mecanismos pelos quais as MMPs atuam no processo inflamatório, sendo isto essencial para o desenvolvimento de terapias alternativas e complementares visando a redução da sintomatologia dolorosa e dos efeitos deletérios associados à inflamação.

Conclusões

A partir dos resultados obtidos neste trabalho podemos resumir as seguintes conclusões:

- ✓ O tratamento de LLLT bloqueou a redução do limiar de sensibilidade mecânica no teste de Von Frey, induzido pela administração intraarticular de Adjuvante Completo de Freund. Os ratos do grupo CFA+LASER mostraram limiar de retirada da cabeça no teste de sensibilidade mecânica (von Frey), semelhante aos limiares dos grupos SAL+SHAM e SAL+LASER no final do experimento. Estes dados sugerem que a LLLT foi eficaz na redução da alodinia mecânica associada ao processo inflamatório intraarticular.
- ✓ A LLLT reduziu o tempo de coceira da região orofacial em ratos do grupo CFA+LASER quando comparado ao grupo CFA+SHAM. Ainda, a sensibilidade nociceptiva orofacial do grupo CFA+LASER mostrou-se semelhante aos grupos SAL+SHAM e SAL+LASER. Estes dados permitem concluir que a LLLT reduz a hiperalgesia orofacial induzida pela administração de agente inflamatório bilateral das ATMs em ratos.
- ✓ No mais, a LLLT reduziu a expressão das MMP-2 e MMP-9, bem como a atividade gelatinolítica das mesmas, em ratos do grupo CFA+LASER nos períodos de 1, 3, 5, 7 e 10 dias de experimentação, quando comparado ao tratamento CFA+SHAM. Assim, é possível hipotetizar que a redução da alodinia mecânica, bem como da hiperalgesia orofacial observada após a LLLT seja, pelo menos em parte, devido à redução da expressão das MMPs no gânglio trigeminal.

Referências Bibliográficas

- AGUGGIA, M. Neurophysiology of pain. *Neurol. Sci.*, 24: 57-60, 2003.
- ALBERTINI, R., AIMBIRE, F.S., CORREA, F.. Effects of different protocol doses of low-power gallium-aluminum-arsenate (Ga-Al-As) laser radiation (650 nm) on carrageenan induced rat paw oedema. *J. Photochem. Photobiol.*, 74: 101–107, 2004.
- AMARAL, A.C.; PARIZOTTO, N. A.; SALVINI, T. F. Dose-dependency of low-energy HeNe laser effect in regeneration of skeletal muscle in mice. *Laser Med. Sci.*, 16: 44-51, 2001.
- AVNI, D.; LEVKOVITZ, S.; MALTZ, L.; ORON, U. Protection of skeletal muscles from ischemic injury: low-level laser therapy increases antioxidant activity. *Photomed. Laser Surg.*, 23: 273-277, 2005.
- BASBAUM, A. I.; JESSEL, T. M. The perception of pain. In: *Principles of neural science*. OKANDEL, E.K.;SCHWARTZ, J. A., JESSEL, T. M. MCGRAW HILL, New York, USA, 4th edition, 472-491, 2000.
- BEM-DOV, N., SHEFER, G., IRINTCHIV, A., WERNIG, A., ORON, U., HALEVY, O. Low energy laser irradiation effects satellite cell proliferation and differentiation in vitro. *Biochem. Biophys. Acta*, 1448: 372-380, 1999.
- BEREITER, D.A., BEREITER, D. F., RAMOS, M. Vagotomy prevents morphine-induced reduction in Fos-like immunoreactivity in trigeminal spinal nucleus produced after TMJ injury in a sex-dependent manner. *Pain*, 96: 205-213, 2002.
- BERTA, T., LIU, T., LIU,Y., X.U, Z., JI, R. Acute morphine activates satellite glial cells and up-regulates IL-1 β in dorsal root ganglia in mice via matrix metalloprotease-9. *Molec. Pain*. 18: 8:, 2012.
- BINSHTOK, A.M., WANG, H., ZIMMERMANN, K., AMAYA, F., VARDECH, D., SHI, L. Nociceptors are interleukin-1 beta sensors. *J. Neurosci.*, 28: 14062-14073, 2008.

- BRAUN, N., SÉRVIGNY, J., ROBSON, S.C., HAMMER, K., HANNANI, M. ZIMMERMANN, H. Association of the Ecto-ATPase NTPDase 2 with glial cells of the peripheral nervous system. *Glia*, 45:124-132, 2004.
- CAMPANA, V., MOYA, M., GAVOTTO, A. He-Ne laser on microcrystalline arthropathies. *J. Clin. Laser Med. Surg.* 21, 99–103, 2003.
- CANDELARIO-JALIL, E., YANG, Y., ROSENBERG, G.A. Diverse roles of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in neuroinflammation and cerebral ischemia. *Neurosci.*, 158: 983-994, 2009.
- CARLSSON, G.E., DEBOEVER, J.A. Epidemiologia. Disfunção da Articulação Temporomandibular e dos Músculos da Mastigação. São Paulo, Livraria Santos; 159-170, 2000.
- CARLSSON, J., KOGNER, P., BILEVICIUTE, I., THEODORSSON, E., APPELGREN, A., APPELGREN B., KOPP, S., LUNDEBERG, T. Effects of capsaicin in temporomandibular joint arthritis in rats. *Arch. of Oral Biol.*, 42: 869-876, 1997.
- CATERINA, M.J., JULIUS, D. Sense and specificity: a molecular identify for nociceptors. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 9:525-530, 1999.
- CAUWE, B., VAN DE STEEN, P.E., OPDENAKKER, G. The biochemical, biological and pathological kaleidoscope of cell surface substrates processed by matrix metalloproteinases. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 42:113-185, 2007.
- CHANDLER, S., COATES, R., GEARING, A., LURY, J., WELLS, G., BONE, E. Matrix metalloproteinases degrade myelin basic protein. *Neurosci. Lett.*, 201: 223-226, 1995.
- CHANG, C., WERB, Z. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol.*, 11: 37-43, 2001.

- CHATTOPADHYAY, S., MYERS, R. R., JANES, J., SHUBAYEV, V. Cytokine regulation of MMP-9 in peripheral glia: Implications for pathological processes and pain in injured nerve. *Brain Behav. Immun.*, 21: 561–568, 2007.
- CHATTOPADHYAY, S, SHUBAYEV, V. MMP-9 controls Schwann cells proliferation and phenotypic remodeling via IGF-1 and ErbB receptor-mediated activation of MEK/ERK pathway. *Glia*, 57: 1316-1325, 2009.
- CLAVELOU, P., PAJOT, J., DALLEL, R., RABOISSON, P. Application of the formalin test to the study of orofacial pain in rat. *Neurosci.Lett.*, 103: 349-353, 1989.
- CORTELLI, P., PIERANGELI, G. Chronic pain-autonomic interactions. *Neurol. Sci.*, 24: 68-70, 2003.
- COSTA, L.F.M., GUIMARÃES, J.P., CHAOBAS, A. Prevalência de distúrbios da articulação temporomandibular em crianças e adolescentes brasileiros e sua relação com má-oclusão e hábitos para-funcionais: um estudo epidemiológico transversal - Parte II: distúrbios articulares e hábitos para-funcionais. *J. Bras. Odont.*, 9: 162-169, 2004.
- CONTI, P.C. FERREIRA, P.M., PEGORARO, L.F., CONTI, J.V., SALVADOR, M.C. A cross-sectional study of prevalence and etiology of signs and symptoms of temporomandibular disorders in high school and university students. *J. Orofac. Pain*, 10: 524-262, 1996.
- DUBLIN, P., HANANI, M. Satellite glial cells in sensory ganglia: their possible contribution to inflammatory pain. *Brain Behav. Immun.*, 21:592-598, 2007.
- DUBOVY, P., KLUSAKOVA, I., SVIZENSKA, I., BRAZDA, V. Satellite glial cells express IL-6 and corresponding signal-transducing receptors in the dorsal root ganglia of rat neuropathic pain model. *Neuron Glia Biol.*, 6:73-83, 2010.
- DUBRUL, E. The craniomandibular articulation. In: Sicher's Oral Anatomy. 7th ed. St Louis: Mosby. 147-209,1980.

- FAVERO, K. Disfunções da articulação temporomandibular: Uma visão etiológica e terapêutica multidisciplinar. Dissertação (Mestrado) - CEFAC: Centro de Especialização em Fonoaudiologia Clínica Motricidade Oral. São Paulo, 1999.
- FIGUEREDO, C.M., CRISPINO, A.F., TINOCO, E. M. B. Níveis elevados de metaloproteinase da matriz-9 em sítios com destruição tecidual de pacientes com periodontite crônica generalizada. R. Clin. Med. Biol., 2: 40-47, 2003.
- FILLIPIN, L.I, MAURIZ, J.L, VEDOVELLI, K., MOREIRA, A.J, ZETTLER, C.G, LECH, O., MARRONI NP, GONZALEZ-GALLEGO J. Low-level lasertherapy (LLLT) prevents oxidative stress and reduces fibrosis in rat traumatized Achilles tendon. Laser Surg. Med. 37:293–300, 2005.
- FOLGUERAS, A.R. Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies. Int. J. Dev. Biol., 48: 411-424, 2004.
- FRICTON, J.R. The relationship of temporomandibular disorders and fibromyalgia: implications for diagnosis and treatment. Curr. Pain Head. Rep., 8(5):355-63, 2004.
- GOLDMAN, J.A. Investigative studies of laser technology in rheumatology and immunology, in: Biomed. Laser Technol. Clinic. Appl.. New York: Springer Verlag, (1981).
- GOTTSCHALL, P.E., DEB, S. Regulation of matrix metalloproteinase expression in astrocytes, microglia and neurons. Neuroimmunomodulation, 3: 69-75, 1996.
- GRABOW, T.S., DOUGHERTY, P.M. Cervicomedullary intrathecal injection of morphine produces antinociception in the orofacial formalin test in the rat. Anestes., 95: 1427-1434, 2001.
- HANANI, M., HUANG, T.Y., CHERKAS, P.S., LEDDA, M., PANNESE, E. Glial cell plasticity in sensory ganglia induced by nerve damage. Neurosci. 114: 279–283, 2002.
- HANANI, M. Satellite glial cells n sensory ganglia: from form to function. Brain Res Rev, 48:457-476, 2005.

HARPER, R.P., KERINS, C.A., TALWAR, R., SPEARS, R., CARLSON, D.S.; MCLNROSH, J.E.

Meal pattern analyses in response to temporomandibular joint inflammation in the rat. *J. Dental Res.* 79: 1704-1711, 2000.

HARPER, R.P., KERINS, C.A., MCLNROSH, J.E., SPEARS, R., BELLINGER, L.L. Modulation of the inflammatory response in the rat TMJ with increasing doses of complete Freund's adjuvant. *J Osteoarthr. Res. Soc. Intern.*, 9: 619-624, 2001.

HAZUDA, D.J., STRICKLER, J., KUEPERS, F., SIMON, P.L., YOUNG, P.R. Processing of precursor interleukin 1 beta and inflammatory disease. *J. Biol. Chem.*, 265: 6318- 6322, 1990.

HOWARD, E.W., BULLEN, E.C., BANDA, M.J. Preferential inhibition of 72- and 92-kDa gelatinases by tissue inhibitor of metalloproteinases-2. *J. Biol. Chem.*, 266: 13070-5, 1991.

HU, P., BEMBRICK, A.L., KEAY, K.A., MCLACHLAN, E.M.. Immune cell involvement in dorsal root ganglia and spinal cord after chronic constriction or transection of the rat sciatic nerve. *Brain Behav. Immun.*, 21: 599-616, 2007.

IMBE, H., IWATA, K., ZHOU. Q.Q., ZOU, S., DUBNER, R., REN, K. Orofacial deep and cutaneous tissue inflammation and trigeminal neuronal activation implications for persistent temporomandibular pain. *Cells Tiss. Org.*, 169: 238-247, 2001.

IMBE, H., REN, K. Orofacial deep and cutaneous tissue inflammation differentially up regulates preprodynorphin mRNA in the trigeminal and paratrigeminal nuclei of the rat. *Mol. Brain Res.*, 37: 87-97, 1999.

ISHIMARU, J.I., OGUMA, Y. GOSS, A.N. Matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase in serum and lavage synovial fluid of patients with temporomandibular joint disorders. *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.*, 38: 354–359, 2000.

IWATA, K., TASHIRO, A., TSUBOI, Y., IMAI, T., SUMINO, R., MORIMOTO, T., DUBNER, R., REN, K. Medullary dorsal horn neuron activity in rats with persistent temporomandibular joint and perioral inflammation. *J. Neurophysiol.*, 82: 1244-1253, 1999.

- JI, R.R., XU, Z.Z., WANG, X., LO, E.H. Matrix metalloproteinase regulation of neuropathic pain. *Trends. Pharmacol. Sci.*, 30: 336-340, 2009.
- KAWASAKI, Y., XU, Z., WANG, X., PARK, J. Y., ZHUANG, Z., TAN, P., GAO, Y. J., ROY, K., CORFAS, G., LO, E. H., JI, R. Distinct roles of matrix metalloproteases in the early- and late phase development of neuropathic pain. *Nat. Med.*, 14: 331–336, 2008.
- KEAST, J.R., ANDESON, T.M. Glutamate and aspartate immunoreactivity in dorsal root ganglion cells supplying visceral and somatic targets and evidence for peripheral axonal transport. *J. Comp. Neurol.*, 424: 577-587, 2000.
- KRANE, S.M. Clinical importance of metalloproteinases and their inhibitors. *Ann. NY Acad. Sci.*, 732: 1-10, 1994.
- KUBOTA, T., KUBOTA, E., MATSUMOTO, A., KAWAI, Y., SAITO, H., MIKUNI-TAKAGAKI, Y., SATO, S. Identification of matrix metalloproteinases (MMPs) in synovial fluid from patients with temporomandibular disorder. *Eur. J. Oral Sci.* 106: 992–998, 1998.
- KULEKCIOGLU, S., SIVRIOGLU, K., OZCAN, O. AND PARLAK, M. Effectiveness of low-level laser therapy in temporomandibular disorder. *Scand. J. Rheumatol.* 32:114–118, 2003.
- LAM, D.K., SESSLE, B.J., CAIRNS, B.E., HU, J.W. Neural mechanisms of temporomandibular joint and masticatory muscle pain: a possible role for peripheral glutamate receptor mechanisms. *Pain Res. Manag.*, 10:145-152, 2005.
- LEE, R., GUO, S.Z., TENG, K.K., HEMPSTEAD, B.L. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Sci.*, 294: 1945-1948, 2001.
- LIU, Y., BERTA, T., LIU, T., TAN, P., JI, R. Acute morphine induces matrix metalloproteinase-9 up-regulation in primary sensory neurons to mask opioid-induced analgesia in mice. *Molec. Pain*, 8:19
- LOESER, J. D., MELZACK, R. Pain: an overview. *Lancet*, 353: 1607-1609; 1999.

- LUND, J. P., LAVIGNE, G. J., DUBNER, R., SESSLE, B. J. Dor orofacial – da ciência básica à conduta clínica. 1ª ed. Quintessence, Rio de Janeiro, Brasil, 2002.
- MACFARLANE, T. V., BLINKHORN, A. S., DAVIES, R. M., KINCEY, J., WORTHINGTON, H. V. Oro-facial pain in the community: prevalence and associated impact. *Comm. Dent. Oral Epidemiol.*, 30: 52-60, 2002.
- MCCAWLEY, L.J., MATRISIAN, L.M. Matrix metalloproteinases: they are not just for matrix anymore. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 13: 534-540, 2000.
- MEDEIROS, J. S., VIEIRA, G.F., NISHIMURA, P.Y. Laser application effects of the bite strength of the masseter muscle, as an orofacial pain treatment. *Photomed. Laser Surg.*, 23(4): 373-376, 2005.
- MEIKEL, M. C. Remodeling. In: *The temporomandibular joint: a biological basis for clinical practice*. 4th ed. Philadelphia: Saunders, 93-107, 1992.
- MERSKEY, H., BOGDUK, N. Classification of chronic pain: description of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. Seattle, IASP Press, 1994.
- MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. *Prog. Neurobiol.*, 57: 1-164, 1999.
- MIZUI, T., ISHIMARU, J.I., MIYAMOTO, K., KURITA, K. Matrix metalloproteinase-2 in synovial lavage fluid of patients with disorders of the temporomandibular joint. *Braz. J. Oral Maxillofac. Surg.*, 39: 310-314, 2001.
- NAGASE, H., WOESSNER, J.F., Matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.*, 274: 21491-21494, 1999.
- NASCIMENTO, G. C., RIZZI, E., GERLACH, R. F., LEITE-PANISSI, C. R. A. Development of the inflammation into the temporomandibular joints promote mechanical and nociceptive orofacial hypersensitivity and alter gelatinases expression in the trigeminal ganglion in rats. Manuscript submitted in *J. Orofacial Pain*, March, 2011.

- NUNEZ, S. C. GARCEZ, A. S., SUZUKI, S. S., RIBEIRO, M. S. Management of mouth opening in patients with temporomandibular disorders through low-level laser therapy and transcutaneous electrical neural stimulation. *Photomed Laser Surg.*, 24: 45-49, 2006.
- OKESON, J. P. *Dor orofacial: guia para avaliação, diagnóstico e tratamento*. São Paulo, Santos Livraria; 1998.
- OLIVEIRA, M.C., PARADA, C.A., VEIGA, M.C., PODRIGUES, L.R., BARROS, S.P., TAMBELI, C.H. Evidence for the involvement of endogenous ATP and P2X receptors in TMJ pain. *Eur. J Pain*, 9: 87-93, 2005.
- PARKS, W.C., WILSON, C.L., LÓPEZ-BOADO, Y.S. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 4: 617-629, 2004.
- PEDRONI, C.R., DE OLIVEIRA, A.S., GUARATINI, M.I. Prevalence study of signs and symptoms of temporomandibular disorders university students. *J. Oral Rehabil.*, 30: 283-289, 2003.
- PEREIRA, A. C., CARMO, E. D., SILVEIRA, V. A. C., ROSA, L. E. B. O papel das MMP-2 e -9 no desenvolvimento do carcinoma epidermóide. *Ver. Bras. Cancer.*, 52: 257-262; 2006.
- PURVES, D., AUGUSTINE, G. J., FITZPATRICK, D., KATZ, L. C., LAMANTIA, A.S., McNAMARA, J. O., WILLIAMS, S. M. *Neurosci.*, 2nd ed., Sunderland (MA), Sinauer Associates, 2001.
- RIZZI, C.F., MAURIZ, J.L., FREITAS CORREA, D.S., MOREIRA, A.J., ZETTLER, C.G., FILIPPIN, L.I., MARRONI, N.P., GONZALEZ-GALLEGU, J. Effects of low-level laser therapy (LLL) on the nuclear factor(NF)-kappa B signaling pathway in traumatized muscle. *Laser Surg. Med.*, 38: 704-713, 2006.
- REDDY, G.K. Photobiological Basis and Clinical Role of Low-Intensity. *Laser Biol. and Med.*, 22(2):141-150, 2004.
- ROVERONI. R.C., PARADA, C.A., CECILIA, M., VEIGA, F.A., TAMBELI, C.H. Development of a behavioral model of TMJ pain in rats: the formalin test. *Pain*, 94: 185-191, 2001.

- SAKURAI, Y., YAMAGUCHI, M., ABIKO, Y. Inhibitory effect of low-level laser irradiation on LPS-stimulated prostaglandin E₂ production and cyclooxygenase-2 in human gingival fibroblasts. *Eur. J. Oral Sci.* 108: 29–34, 2000.
- SERRA, J. Overview of neuropathic pain syndromes: new advances in the treatment of neuropathic pain. *Acta Neurol. Scand.*, 173: 7-11, 1999.
- SHEFER, G., BARASH, I., ORON, U., HALEVY, O. Low-energy laser irradiation enhances of new protein synthesis via its effects on translation-regulatory proteins in skeletal muscle myoblasts. *Biochem. Biophys. Acta*, 1593:131-139, 2003.
- SHIMIZU, N., YAMAGUCHI, M., GOSEKI, T., et al. Inhibition of prostaglandin E₂ and interleukin 1 beta production by low-power laser irradiation in stretched human periodontal ligament cells. *J. Dental Res.*, 74: 1382–1388, 1995.
- SHINMEI, M., MASUDA, K., KIKUCHI, T. The role of cytokines in chondrocyte mediated cartilage degradation. *J. Rheumatol.*, 18: 32–34, 1989.
- SCHONBECK, U., MACH, F., LIBBY, P. Generation of biologically active IL-1 beta by matrix metalloproteinases a novel caspase-1-independent pathway of IL-1 beta processing. *J. Immunol.*, 161: 3340-3346, 1998.
- SPATARO, L.E., SLOANE, E.M., MILLIGAN, E.D. WEISELER-FRANK, J., SCHOENINGER, D., JEKICH, B.M., BARRIENTOS, R.M., MAIER, S.F., WATKINS, I.R. Spinal gap junctions: potencial involvement in pain facilitation. *J. Pain*, 5: 392-405, 2004.
- SORSA, T., TJÄDERHANE, L, SALO, T. Matrix metalloproteinases in oral diseases. *Oral Diseases* 10: 311-318, 2004.
- SRINIVAS, R., SORSA, T., TJADERHANE, L., NIEMI, E., RAUSTIA, A., PERNU, H. Matrix metalloproteinases in mild and severe temporomandibular joint internal derangement synovial fluid. *Oral Surg., Oral Med., Oral Pathol., Oral Radiol. Endodontic.* 91: 517-24, 2001.

- STAMENKOVIC, I. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *Semin. Cancer Biol.*, 10: 415-433, 2000.
- TANAKA, A., KUMAGAI, S., KAWASHIRI, S., TAKATSUKA, S., NAKAGAWA, K., YAMAMOTO, E. e cols. Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 in synovial fluid of the temporomandibular joint accompanied by anterior disk displacement. *J. Oral Pathol Med.* 30: 59-64, 2001.
- TALHOUK, R.S., HAJJAR, L., ABOU-GERGI, R., SIMAA, C.J., MOUNEIMME, G., SAADE, N.E., SAFIEH-GARABEDIAN, B. Functional interplay between gelatinases and hyperalgesia in endotoxin-induced localized inflammatory pain. *Pain.* 84: 397-405, 2000.
- TING, A.L., KAI, A.L., FEI-YU A.Z., ZHEN-KANG A.Z., ALAN, R.L.B., KAI-YUAN, F. Dissociation of spinal microglia morphological activation and peripheral inflammation in inflammatory pain models. *J. Neuroimm.* 192: 40-48, 2007.
- TSUDA, M., INOUE, K., SALTER, M.W. Neuropathic pain and spinal microglia: a big problem from molecules in small glia. *Trends Neurosci.*, 28: 101-107, 2005.
- TSUDA, M., SHIGEMOTO-MOGAMI, Y., KOIZUMI, S., MIZOKOSHI, A., KOHSAKA, S., SALTER, M.W., INOUE, K. P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature* 424: 778-783, 2003.
- XIE, W., STONG, J.A., ZHANG, J.M. Early blockade of injured primary sensory afferents reduces glial cell activation in two rat neuropathic pain models. *Neurosci.*, 160: 847-857, 2009.
- WATKINS, L.R., AND MAIER, S.M. Beyond neurons: evidence that immune and glial cells contribute to pathological pain states. *Physiol. Rev.*, 82:981-1011, 2002.
- WILCZYNSKI, G.M., et al. Important role of matrix metalloproteinases 9 in epitheliogenesis. *J. Cell Biol.*, 180:1021-1035, 2008.

- YAMASAKI, Y., REN, K., SHIMADA, M., IWATA, K. Modulation of paratrigeminal nociceptive neurons following temporomandibular joint inflammation in rats. *Exp. Neurol.*, 214: 209-218, 2008.
- YOUNG, V.W. Metalloproteinases: mediators of pathology and regeneration in the CNS. *Nat. Rev. Neurosci.*, 6: 931-944, 2005.
- ZHOU, Q.Q., IMBE, H., DUBNER, R., REN, K. Persistent Fos protein expression after orofacial deep or cutaneous tissue inflammation in rats: implications for persistent orofacial pain. *J. Comp. Neurol.*, 412: 276-291, 1999.