UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Psicologia
Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia

“Avaliação da sensibilidade nociceptiva e do comportamento emocional após estresse agudo e crônico em ratos com inflamação persistente nas ATMs e o possível envolvimento de receptores para CRF”.

Ana Paula Ribeiro Novaes Marquezi

Ribeirão Preto

2014

ANA PAULA RIBEIRO NOVAES MARQUEZI

Avaliação da sensibilidade nociceptiva e do comportamento emocional após estresse agudo e crônico em ratos com inflamação persistente nas ATMs e o possível envolvimento de receptores para CRF.

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto-USP, para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Psicobiologia.

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

Ribeirão Preto

2014

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

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central do Campus USP – Ribeirão Preto.

Novaes-Marquezi, Ana Paula Ribeiro.

Avaliação da sensibilidade nociceptiva e do comportamento emocional após estresse agudo e crônico em ratos com inflamação persistente nas ATMs e o possível envolvimento de receptores para CRF. Ribeirão Preto, 2014.

83 p.: il: 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Psicobiologia.

Orientadora: Leite-Panissi, Christie Ramos Andrade

1. Disfunção temporomandibular; 2. Estresse; 3. Sensibilidade nociceptiva; 4. Comportamento emocional.; 5. CRF

FOLHA DE APROVAÇÃO

Ana Paula Ribeiro Novaes Marquezi

Avaliação sensibilidade nociceptiva e do comportamento emocional após estresse agudo e crônico em ratos com inflamação persistente nas ATMs e o possível envolvimento de receptores para CRF.

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto-USP, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Psicobiologia.

Aprovado em: ____/____/____.

Banca Examinadora

Prof. Dra. Christie Ramos Andrade Leite-Panissi

Instituição: FORP – USP

Assinatura: _____

Prof. Dr.

Instituição:

Assinatura: _____

Prof. Dr.

Instituição:

Assinatura: _____

Prof. Dr.

Instituição:

Assinatura: _____

Prof. Dr.

Instituição:

Assinatura: _____

Dedico,

*A minha filha **Ana Luiza**, meu presente de Deus, que me ensinou o significado do
amor incondicional.*

*Aos meus pais **Paulo e Raquel** que por uma vida de dedicação, amor e trabalho me
ofereceram a oportunidade de realizar sonhos e conquistas. E a minha irmã **Juliana**,
amiga querida, pelo carinho e incentivo em todos os momentos.*

*Ao meu esposo **Jorge**, pelo amor, companheirismo e incentivo, sem os quais não
teria tido êxito ao longo dessa caminhada.*

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, que por Sua presença, luz e força sempre me abençoa e capacita para tudo aquilo que Ele me destina.

À **Profa. Dra. Christie Ramos Andrade Leite-Panissi**, minha orientadora e amiga, agradeço pelo convívio, pela disponibilidade, paciência, compreensão, apoio e carinho quando me deparei com minhas dificuldades. Daqui somente levo lições e momentos positivos.

À **Profa. Dra. Karina Genaro Borelli**, por acompanhar o desenvolvimento deste trabalho sempre visando ao seu aprimoramento.

À **Profa. Dra. Claudia Maria Padovan**, por sua atenção, colaboração e valiosas sugestões para este trabalho.

Aos **Professores da Banca**, pela atenção dispensada na leitura deste trabalho.

À **Patrícia Adriana Basile**, pela colaboração e auxílio na obtenção dos resultados deste trabalho.

Agradeço aos amigos que fiz durante minha trajetória acadêmica: **Alberto, Amanda, Bruna, Daniela, Eveline, Glauce, Jardel, Jeane, Priscila e Richard**, pela amizade, suporte e colaboração durante esses anos de convívio. Em especial, à **Glauce** por sua prontidão e carinho em me ajudar na realização deste trabalho.

À **Renata B. Vicentini**, secretária do Programa de Pós - Graduação em Psicobiologia da FFCLRP - USP, pelo auxílio competente.

Aos funcionários do Biotério I da FORP, **Aline Aparecida Ferraresi Tibali, Antônio Sérgio Ap. Mesca e Antônio Massaro**, pelo cuidado e tratamento constante dos animais experimentais.

À **CAPES** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e **FAPESP** pelo auxílio financeiro.

***“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar.
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.***

Madre Teresa de Clacutá

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1:</i>	Fotografia ilustrando a aplicação de solução salina 0,9 % ou adjuvante completo de Freund (CFA, 50 µL) na articulação temporomandibular (ATM) de um animal experimental.	31
<i>Figura 2:</i>	Fotografia representativa da avaliação da sensibilidade mecânica orofacial utilizando o anesthesiômetro modelo Von Frey.	32
<i>Figura 3:</i>	Fotografia do aparato utilizado para avaliação da nocicepção térmica.	33
<i>Figura 4:</i>	Fotografia do aparato utilizado no teste do labirinto em cruz elevado (LCE).	34
<i>Figura 5:</i>	Fotografia do aparato utilizado para realização do estresse de restrição.	34
<i>Figura 6</i>	Fotografia dos procedimentos de estresse variado	35
<i>Figura 7:</i>	Média do extravasamento plasmático do corante Azul de Evans, 15 dias após a administração de solução salina 0,9 % (SAL, n = 7) ou adjuvante completo de Freund (CFA, n = 7) bilateralmente na ATM de ratos.	44
<i>Figura 8:</i>	Média da concentração de corticosterona plasmática (ng/ml) em ratos com (CFA) ou sem (SAL) inflamação persistente das ATMs, submetidos (EA, ECV, ECR) ou não (Controle) a diferentes protocolos de estresse.	45
<i>Figura 9:</i>	Média do limiar de retirada (em gramas), após a aplicação de estímulo mecânico inócuo orofacial, antes (Basal) ou 15 dias após o tratamento intra-articular (ATM bilateral) com (CFA) ou solução salina 0,9% estéril (SAL), e submetidos (EA, ECV, ECR) ou não (Controle) a diferentes protocolos de estresse.	47
<i>Figura 10:</i>	Média do Índice de Antinocicepção no teste da placa quente (IA), antes (Basal) ou 15 dias após o tratamento intra-articular (ATM bilateral) com (CFA) ou solução salina 0,9% (SAL), e submetidos a diferentes protocolos	48

de estresse (EA, ECV, ECR) ou não.

- Figura 11:** Média do número de entradas nos braços abertos (BA, A), do número de entradas nos braços fechados (BF, B) e da porcentagem de tempo nos braços abertos (%TBA, C) em ratos tratados com solução salina 0,9% (SAL) ou adjuvante completo de Freund (CFA) intra-articular (ATM bilateral), e submetidos a diferentes protocolos de estresse (EA, ECV, ECR) ou não. 50
- Figura 12:** Média do limiar de retirada (em gramas), após a aplicação de estímulo mecânico inócuo orofacial), no antes (Basal) ou 15 dias após a administração intra-articular (ATM bilateral) com (CFA) ou solução salina 0,9% (SAL), e submetidos ao tratamento sistêmico crônico (10 dias, 2 vezes ao dia) com imipramina (IMI, 15 mg/kg, via i.p.) ou solução salina 0,9% (1mL/kg, via i.p.). 52
- Figura 13:** Média do Índice de Antinocicepção no teste da placa quente (IA), antes (Basal) ou 15 dias após a administração intra-articular (ATM bilateral) com (CFA) ou solução salina 0,9% (SAL), e submetidos ao tratamento sistêmico crônico (10 dias, 2 vezes ao dia) com imipramina (IMI, 15 mg/kg, via i.p.) ou solução salina 0,9% (1mL/kg, via i.p.). 53
- Figura 14:** Média do número de entradas nos braços abertos (BA, A), do número de entradas nos braços fechados (BF, B) e da porcentagem de tempo nos braços abertos (%TBA, C) em ratos tratados com solução salina 0,9% (SAL) ou adjuvante completo de Freund (CFA) intra-articular (ATM bilateral), e submetidos ao tratamento sistêmico crônico (10 dias, 2 vezes ao dia) com imipramina (IMI, 15 mg/kg, via i.p.) ou solução salina 0,9% (1mL/kg, via i.p.) SAL+ECR. 55
- Figura 15:** Índice de Antinocicepção do teste de placa quente (IAPQ) de ratos que receberam injeção bilateral na região das ATMs de 50 µL de solução salina 0,9 % ou CFA (50 µL CFA em suspensão (óleo/salina 1:1) e 15 dias após receberam microinjeção de salina (0,9%, 0,2 µL), de agonista do receptor CRF na dose 1,0µg/0,2µL ou do antagonista do receptor CRF (α -hCRF) na 57

dose 1,0µg/0,2µL no núcleo central da amígdala.

- Figura 16:** Representação esquemática de secções frontais obtidas em planos representativos da amígdala de ratos. 58
- Figura 17:** Fotomicrografia de um corte transversal do encéfalo de rato com cânula-guia dirigida para o núcleo central da amígdala após coloração pela técnica de Nissl (cresil violeta). 59

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH	Hormônio adrenocorticotrópico
AMPc	Adenosina 3'5' monofosfato cíclico
ATM	Articulação Temporomandibular
ATP	Adenosina Trifosfato
Aδ	Fibras A-delta
BA	Braços abertos
BF	Braços fechados
BLA	Núcleo Basolateral da Amígdala
CEA	Núcleo Central da Amígdala
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
CFA	Adjuvante Completo de Freund
CGRP	Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina
CRF	Fator Liberados de Corticotropina
DTM	Disfunção Temporomandibular
EA	Estresse Agudo
ECR	Estresse Crônico de Restrição
ECV	Estresse Crônico Variado
EPM	Erro Padrão da Média
EKR	Proteína Quinase Sinalizadora
HPA	Hipotálamo-Pituitária-Adrenal
i.c.v.	Intracerebroventricular
i.p	Intraperitoneal
IA	Índice de Antinocicepção
IAPQ	Índice de Antinocicepção da placa quente
IASP	Associação Internacional para o estudo da dor
IL-1β	Interleucina 1 beta
IMI	Imipramina
LB	Linha de base
LCE	Labirinto em cruz elevado
NMDA	N-metil D-Aspartato
Pb	Núcleo Parabraquial
Pbel	Região lateral externa da área parabraquial
PBS	Salina Tamponada
PE	Polietileno
PKA	Proteína Quinase A
RVM	Bulbo ventromedial rostral
SAL	Salina

SCP	Substância Cinzenta Periaqueductal
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
TA	Tempo nos braços abertos
TF	Tempo nos braços fechados
%TBA	Porcentagem de tempo nos Braços Abertos
TO	Trato Ótico
5HT	Serotonina

RESUMO

NOVAES-MARQUEZI, A.P.R. *Avaliação da sensibilidade nociceptiva e do comportamento emocional após estresse agudo e crônico em ratos com inflamação persistente nas ATMs e o possível envolvimento de receptores para CRF*. 2014. 83 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP - Ribeirão Preto, 2014.

Condições músculo-esqueléticas como as desordens da articulação temporomandibular (ATM) são as principais causas de dor não odontogênica na região orofacial e incluem um grupo de condições usualmente acompanhadas de dor na região das ATMs e dos músculos mastigatórios, limitação da abertura bucal e dores de cabeça. Pacientes com desordens da articulação temporomandibular (DTM) também podem apresentar desordens relacionadas ao estresse caracterizadas por alterações somáticas e psicológicas como fadiga, distúrbios do sono, ansiedade e depressão. A causa exata das DTMs ainda não é completamente entendida, mas acredita-se que envolva fatores fisiológicos, comportamentais e ambientais. É possível que alguns sintomas de DTM e dor orofacial sejam apenas manifestações somáticas de estresse emocional. De fato, situações de estresse promovem uma série de mudanças fisiológicas e comportamentais que podem afetar os sistemas hormonais e de neurotransmissores. Estudos demonstraram que o CRF e seus receptores medeiam respostas comportamentais, endócrinas e autonômicas para o estresse, além de estar envolvidos em outras funções, como na modulação nociceptiva. O objetivo deste trabalho foi avaliar a nocicepção e o comportamento emocional em ratos com inflamação persistente nas ATMs, induzida por administração de adjuvante completo de Freund (CFA) em diferentes situações de estresse (agudo - EA, crônico repetido - ECR e crônico variado - ECV), bem como a ação do antidepressivo tricíclico (inibidor da recaptação de catecolaminas), imipramina, nessas respostas. Ainda, investigou-se o possível envolvimento de receptores CRF do núcleo central da amígdala (CEA) na modulação nociceptiva de animais com inflamação persistente das ATMs. Os resultados mostraram que a inflamação persistente das ATMs promoveu alodinia mecânica orofacial e hiperalgesia secundária. O EA *per se* promoveu analgesia nos animais sem inflamação das ATMs, além de reverter a alodinia mecânica e a hiperalgesia secundária induzidos pelo CFA intra-articular. Ainda, o ECV e o ECR promoveram *per se* hiperalgesia nos animais sem inflamação, mas não alteraram o efeito da administração intra-articular de CFA. Em adição, a inflamação persistente das ATMs promoveu alterações comportamentais com efeitos ansiogênicos significativos que não foram alterados pela exposição dos animais ao EA ou ECR. Em contrapartida, o ECV demonstrou efeito ansiogênico nos animais sem inflamação, porém não houve alterações nos animais com inflamação persistente nas ATMs. Em adição, a administração de imipramina reverteu a hiperalgesia, exercendo, dessa forma, efeito analgésico, e o efeito ansiogênico causado pelo CFA intra-articular. Com relação ao envolvimento de receptores para CRF no CEA verificamos que sua

ativação promoveu analgesia nos animais sem inflamação das ATMs e ainda reverteu a hiperalgesia decorrente da administração intra-articular do CFA. Assim, nossos resultados sugerem que a inflamação persistente nas ATMs induzida por CFA produz efeitos ansiogênicos e aumenta a sensibilidade nociceptiva, bem como situações de estresse agudo e crônico podem modular essas alterações. Ainda, os efeitos da inflamação persistente podem ser revertidas pelo tratamento sistêmico com imipramina, e pela administração de agonista de receptores CRF no CEA.

Palavras Chaves: Disfunção temporo-mandibular, Estresse; Sensibilidade nociceptiva; Comportamento emocional; CRF.

ABSTRACT

NOVAES-MARQUEZI, A.P.R. Evaluation of acute and chronic stress in nociceptive sensibility and emotional behavior in rats with persistent inflammation of the temporomandibular joints the possible involvement of CRF receptors. 2014. 83 f. Thesis (PhD) – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP - Ribeirão Preto, 2014.

Musculoskeletal conditions such as disorders of the temporomandibular joint (TMJ) are the main cause of non-odontogenic pain in the orofacial region and include a group of conditions usually accompanied by pain in TMJ region and masticatory muscles, limitation of mouth opening and headache. Patients with temporomandibular joint disorders (TMD) may also show related stress disorders characterized by somatic and psychological changes such as fatigue, sleep disturbances, anxiety and depression. The exact cause of TMD is not yet completely clarified, but is believed to involve physiological, behavioral and environmental factors. It is possible that some symptoms of TMD and orofacial pain are only somatic manifestations of emotional stress. In fact, stressful situations promote a series of physiological and behavioral changes that may affect hormonal and neurotransmitter systems. Studies have shown that CRF and its receptors mediate behavioral, endocrine and autonomic responses to stress, in addition to being involved in other functions such as nociceptive modulation. The aim of this study was to evaluate emotional behavior and nociception in rats with persistent inflammation in TMJ induced by administration of complete Freund's adjuvant (CFA) in different stress situations (acute stress - AS, chronic restraint stress - CRS and unpredictable chronic stress - UCS) and the action of the tricyclic antidepressant (catecholamine reuptake inhibitor), imipramine, in these responses. In addition, we investigated the possible involvement of CRF receptors in the central nucleus of the amygdala (CEA) in nociceptive modulation in animals with persistent inflammation of the TMJs. The results have shown that persistent TMJ inflammation produced mechanical orofacial allodynia and widespread secondary hyperalgesia. AS induced analgesia in animals without TMJ inflammation and reversed both mechanical allodynia and secondary hyperalgesia induced by intra-articular CFA injection. In addition, CRS and UCS induced hyperalgesia in animals without inflammation, but did not alter the effect of intra-articular administration of CFA. Also, the persistent inflammation of the TMJ promoted behavioral changes with significant ansiogenic effects that were not altered by exposure of the animals to AS or CRS. In contrast, UCS showed ansiogenic effect in animals without inflammation, but no changes in animals with persistent TMJ inflammation. In addition, administration of imipramine had an ansiogenic and analgesic effect, reversing the hyperalgesia caused by intra-articular CFA administration. Regarding the involvement of CRF receptors in the CEA this study demonstrated that this activation promoted analgesia in animals without inflammation of the TMJ and was able to reverse the hyperalgesia caused by intra-articular CFA

administration. Thus, our results suggest that persistent temporomandibular inflammation induced by CFA produces anxiogenic effects and decreases nociceptive sensitivity and situations of acute and chronic stress can modulate these changes. In addition, these changes can be reversed by systemic treatment with imipramine and by administration of CRF receptor agonist in CEA.

Keywords: Temporomandibular disorders; Stress; Nociceptive behavior; Anxiety-like behavior, CRF.

SUMÁRIO

I.	INTRODUÇÃO	18
1.	Disfunção Temporomandibular	18
2.	Sensibilidade Nociceptiva	20
3.	Modulação Nociceptiva	22
4.	Estresse e Modulação da Dor	24
5.	Fator Liberador de Corticotropina	27
II.	OBJETIVOS	30
III.	MATERIAIS E MÉTODOS	31
1.	Animais	31
2.	Indução de Inflamação na ATM	31
3.	Avaliação da Sensibilidade Mecânica Orofacial	32
4.	Teste de Placa Quente	32
5.	Labirinto em Cruz Elevado	33
6.	Estresse Agudo	34
7.	Estresse Crônico	34
8.	Verificação e quantificação do extravasamento plasmático na ATM	35
9.	Dosagem de Corticosterona	36
10.	Procedimento Cirúrgico	36
11.	Cânula guia e microinjeção	37
12.	Fármacos	38
13.	Histologia	38
14.	Protocolos Experimentais	38
15.	Eutanásia	42
16.	Análise dos resultados	42
IV.	RESULTADOS	44
1.	Protocolo 1: Avaliação do estresse agudo, crônico repetido ou crônico variado na resposta nociceptiva aguda e do comportamento emocional em ratos portadores de inflamação persistente nas ATMs induzida por CFA.	44
2.	Protocolo 2: Avaliação do tratamento com antidepressivo tricíclico, imipramina, na resposta nociceptiva aguda e no comportamento emocional em ratos portadores de inflamação persistente nas ATMs induzida por CFA.	51
3.	Protocolo 3: Efeito da administração de agonista e antagonista para receptores CRF no núcleo central da amígdala na sensibilidade nociceptiva em ratos portadores de inflamação persistente das ATMs.	56
V.	DISCUSSÃO	60
1.	Avaliação da resposta nociceptiva e do efeito de diferentes situações de estresse sobre essa resposta em ratos portadores de inflamação persistente nas ATMs.	60
2.	Avaliação do efeito da administração de agonista e antagonista para receptores CRF no núcleo central da amígdala na sensibilidade nociceptiva em ratos portadores de inflamação persistente das ATMs.	68
VI.	CONCLUSÃO	71
VII.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

I. INTRODUÇÃO

1. Disfunção Temporomandibular

As articulações temporomandibulares (ATMs) são formadas pelo côndilo mandibular que se encaixa na fossa mandibular do osso temporal. Separando esses dois ossos está o disco articular interposto que evita o contato direto dessas estruturas (OKESON, 1998). As superfícies articulares das ATMs são forradas 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. Assim, é possível que o tratamento das condições artríticas das ATMs possa ser diferente de outras articulações sinoviais presentes no organismo (MEIKLE, 1992). Ainda, é importante ressaltar que as desordens da articulação temporomandibular, em conjunto com desordens dos músculos cervicais e mastigatórios e desordens da espinha cervical, constituem a etiologia da dor de origem não odontogênica na região orofacial (BELL, 1989; LUND e cols., 2002).

A classificação das desordens temporomandibulares (DTMs), de acordo com a Academia Americana de Dor Orofacial, inclui um grupo heterogêneo de condições não articulares e articulares que usualmente apresentam sinais e sintomas similares (LUND e cols., 2002). Atualmente o termo DTM refere-se aos sinais e sintomas associados à dor e distúrbios funcionais e estruturais do sistema mastigatório, especialmente das ATMs, dos músculos mastigatórios ou ambos (MCNEILL, 1993; OKENSON, 1996). Além da sintomatologia dolorosa, as DTMs podem ser acompanhadas de limitação da abertura bucal e dores de cabeça (DWORKIN e cols., 1990; CARLSSON e DEBOEVER, 1994; DENUCCI e cols., 1996; SARLANI e GREENSPAN, 2003; TURP e cols., 1998). No Brasil, a ocorrência das DTMs sintomáticas é de 40 a 60% na população adulta (CONTI e cols., 1996; PEDRONI e cols., 2003).

A causa exata das DTMs ainda não é completamente entendida, mas acredita-se que envolva fatores fisiológicos, comportamentais e ambientais (GAMEIRO e cols., 2006a). Dentro desta perspectiva, a inflamação que ocorre na região das ATMs tem sido considerada como a causa da dor nos pacientes portadores de DTM (YAMASAKI e cols., 2008). Essa inflamação pode ocorrer na membrana sinovial (sinovite) e/ou na cápsula (capsulite), podendo resultar de trauma local, infecção ou degeneração, ou ser parte de patologias relacionadas a formação e manutenção do colágeno ou poliartrite sistêmica, como por exemplo, artrite reumatóide (LUND e cols., 2002). Para o estudo experimental, existem muitos modelos que utilizam substâncias capazes de promover inflamação articular, entre estes, estão o adjuvante completo de Freund (CFA), óleo de mostarda, formalina, adenosina trifosfato (ATP) e glutamato (BEREITER e cols., 2002; RO, 2003; IMBE e

REN, 1999; LAM e cols., 2005; OLIVEIRA e cols., 2005; ROVERONI e cols., 2001). Dentre os modelos utilizados, a administração intra-articular de CFA é considerado confiável para produzir inflamação de longa duração após sua injeção local, promovendo dor aguda e de longa duração (YAMASAKI e cols., 2008). Ainda, a inflamação experimental das ATMs está associada com dor tecidual profunda, a qual é geralmente referida para a pele (IWATA e cols., 1999; IMBE e cols., 2001). Isso permite avaliar as alterações da sensibilidade dolorosa, induzida pela administração de CFA nas ATMs através da pele facial sem a necessidade de manipulação invasiva.

Em pacientes portadores de DTM persistente, a dor é pobremente localizada e se difunde para outras regiões craniofaciais (REID e cols., 1994; TURP e cols., 1998). Trabalhos prévios demonstraram que a dor, hiperalgesia ou alodinia espalham-se para outras áreas em várias situações de dor crônica (MORIWAKI e YUGE, 1999; BARON, 2000; MALEKI e cols., 2001; SCOTT e cols., 2005) incluindo a dor associada à DTMs em seres humanos (MAIXNER e cols., 1995, 1998; TURP e cols., 1998). Muitos experimentos clínicos demonstraram sensibilidade à dor aumentada, em pacientes portadores de DTM, a estímulos nocivos aplicados fora da região orofacial e do pescoço (SARLANI e GREENSPAN, 2003). Além disso, estudo realizado com ratos demonstrou que a inflamação do músculo masseter provocada pela administração de CFA induziu alodinia mecânica secundária crônica e disseminada que se estende além da região da cabeça para as patas traseiras (AMBALANAVAR, 2006). É importante ressaltar que pacientes com DTM também podem apresentar desordens relacionadas ao estresse caracterizadas por alterações somáticas e psicológicas como fadiga, distúrbios do sono, ansiedade e depressão (KORSZUN e cols., 1996; HANSDOTTIR e BAKKE, 2004).

Na pesquisa odontológica, a oclusão dental e as atividades parafuncionais foram os fatores etiológicos que receberam maior atenção nos estudos epidemiológicos sobre as DTMs (MAGNUSON e cols., 2000; THILANDER e cols., 2002). Porém desde o início da década de 1950, surgiram trabalhos demonstrando possível etiologia emocional para as DTMs. Estudo de Moulton (MOULTON, 1955) avaliou 35 pacientes com DTM, utilizando questionários e entrevistas, e concluiu que além de serem extremamente ansiosos, os portadores de DTM, apresentaram sintomas físicos, relacionados à ansiedade, tais como dores difusas e tensão muscular, entre outros sinais. Ainda, o autor concluiu que a tensão emocional e ansiedade, em um determinado momento crítico, podem resultar em sintomas orofaciais. Seguindo esta linha de investigação, Laskin (1969) propôs a teoria psicofisiológica da dor miofascial, responsabilizando fatores emocionais pelo desenvolvimento das DTMs ao invés de fatores físicos. De acordo com essa teoria e estudos subsequentes, o estresse induz hiperatividade muscular, o qual resulta em fadiga e espasmos, tendo como consequência contratura muscular, desarmonia oclusal, e artrite degenerativa. Essas consequências seriam responsáveis pela alteração do padrão oclusal durante a mastigação, e

portanto, seria o efeito e não a causa da dor decorrente das DTMs (POVEDA-RODA e cols., 2007). De fato, fatores psicológicos têm sido relacionados com a pré-disposição, o início e com a perpetuação das DTMs (SIPILA e cols., 2001; ROLLMAN e GILLESPIE, 2000).

Ao considerar os fatores psicológicos e emocionais, os estados mais estudados são a ansiedade e o estresse (RUGH e cols., 1993; CARLSON e cols., 1998; LINDROTH e cols., 2002). Ambos influenciam as DTMs e outras condições dolorosas de diferentes formas. Além disso, Evaskus e Laskin (1972) observaram aumento dos níveis de catecolaminas e esteroides, na urina de pacientes portadores de DTM, sugerindo que estes indivíduos estavam sob maior estresse psicológico. De fato, estudos demonstraram que indivíduos com DTM apresentaram maior grau de estresse, depressão e ansiedade quando comparados com os grupos controle saudáveis, e que alguns sintomas de DTM e dor orofacial podem ser apenas manifestações somáticas do estresse emocional (KNUTSSON e cols., 1989; MCCREARY e cols., 1991; GATCHEL e cols., 1996; JONES e cols., 1997). Ainda, estudo de Katz e cols. (1989) demonstrou que o estresse induzido experimentalmente resultou em magnitude significativamente maior na eletromiografia dos músculos temporal e masseter em pacientes com DTM quando comparados com indivíduos não submetidos à condição de estresse, ou a indivíduos saudáveis submetidos ao estresse. Dessa forma, essas observações corroboram a hipótese psicofisiológica de que os pacientes com DTM respondem sob estresse de maneira diferente de indivíduos assintomáticos. De fato, pacientes portadores de DTM relataram que os sintomas dolorosos aumentam durante situações estressantes (SUVINEN e cols., 1997).

Em laboratório, a análise da ansiedade ou de outras alterações emocionais, tais como a depressão ou o efeito de diferentes protocolos de estresse, pode ser realizada por meio da avaliação da atividade exploratória de animais experimentais em teste de campo aberto (KENNET e cols., 1987), no labirinto em cruz elevado (PELLOW e cols., 1985; PADOVAN e GUIMARÃES, 2000; GAMEIRO e cols., 2006b), no teste claro-escuro (BOUWKNECHT e PAYLOR, 2001), entre outros.

2. Sensibilidade Nociceptiva

Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP, 2006), a dor pode ser definida como uma *“experiência sensorial e emocional desagradável, associada a um dano tissular real ou potencial ou ainda, descrita em termos que sugerem tal dano”*. Esta sensibilidade é de suma importância para a sobrevivência dos animais, desde que representa importante ganho do ponto de vista evolutivo, funcionando como um mecanismo sinalizador contra danos teciduais ou elementos potencialmente prejudiciais ao organismo, evocando uma resposta sensorial e motora de proteção (AGUGGIA, 2003; CORTELLI e PIERANGELI, 2003).

Os primeiros estudos sobre os mecanismos responsáveis pela percepção dolorosa foram realizados por Sherrington (1906), que propôs a existência dos nociceptores, ou seja, de terminações nervosas livres que se encontram nas fibras aferentes primárias e são ativados por estímulos capazes de provocar lesão tecidual (JULIUS e BASBAUM, 2001). Existem dois tipos de fibras aferentes responsáveis por conduzir a informação dolorosa: as fibras mielínicas A-delta ($A\delta$), responsáveis pela condução rápida da dor (5-30 m/s) e as fibras amielínicas C, responsáveis pela condução lenta da dor (menor que 2 m/s). Os nociceptores ligados a fibras $A\delta$ respondem à estimulação mecânica e térmica intensas, enquanto os nociceptores das fibras C respondem à estimulação mecânica, térmica e química intensas e promovem sensação de queimação sem localização precisa (MARQUEZ, 2004). A partir da ativação dos receptores a informação nociceptiva é transmitida pelos aferentes primários até as lâminas I, II, V, VI e X da substância cinzenta da medula espinhal, onde realizam sinapses com os aferentes secundários, os quais são neurônios nociceptivo específicos ou neurônios de larga faixa (MILLAN, 1999; LENT, 2001). A comunicação entre os aferentes primários e secundários ocorre pela liberação de uma diversidade de substâncias envolvidas na transmissão central e modulação da informação nociceptiva, dentre eles, os aminoácidos excitatórios, como o glutamato e o aspartato, e neuropeptídeos, como a substância P (TEIXEIRA, 2006; TODD e KOERBER, 2006).

A neuroanatomia e organização das vias ascendentes da dor são altamente complexas. Os feixes ascendentes formam dois sistemas filogeneticamente diferentes. O primeiro ascende pela região média do tronco encefálico sendo formado pelos feixes: espinotalâmico, espinoreticular, espinomesencefálico, espinoparabraquio-amidalóide, espinoparabraquio-hipotalâmico, espinoparabraquio-hipotalâmico e neoespinotalâmico. Essas vias projetam-se diretamente para estruturas encefálicas e estão relacionadas com a transmissão da dor rápida ou aguda, possuem poucas sinapses e dirigem-se para o córtex somatossensorial primário. O segundo sistema ascende via região lateral do tronco encefálico e consiste no conjunto dos tratos paleoespinotalâmico, espinocervical e feixe pós-sináptico do corno dorsal. Estas são vias possuem várias estações relés em estruturas bulbares, pontinas e mesencefálicas antes de alcançar estruturas prosencefálicas (ALMEIDA e cols., 2004; DOSTROVSKY e CRAIG, 2006).

A sensação dolorosa pode ser classificada de diferentes formas dependendo do critério adotado. Do ponto de vista fisiológico a dor pode ser classificada em três tipos: nociceptiva, inflamatória e neuropática. A dor nociceptiva é um mecanismo de defesa que protege o organismo de um dano potencial ou iminente e é produzida, assim como suas consequências fisiológicas, pelo funcionamento normal tanto do Sistema Nervoso Central (SNC) quanto do Sistema Nervoso Periférico (SNP). As dores inflamatória e principalmente a dor neuropática, em contraste, são reflexos do funcionamento patologicamente modificado desses dois sistemas (SALTER, 2005). A

dor inflamatória é caracterizada pela espontaneidade da sensação dolorosa e pela hiperalgesia (MAMET e cols., 2003), quando há presença de mediadores inflamatórios, enquanto a dor neuropática é uma condição crônica que ocorre ou persiste após lesão primária ou disfunção no sistema nervoso central ou periférico (ZIEGLGANSBERGER e cols., 2005).

A condição dolorosa também 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 estímulo potencialmente nocivo ao tecido. Sendo assim, é um importante sinalizador da integridade de todos os tecidos, iniciando respostas protetoras (SERRA, 1999; AGUGGIA e cols., 2003; CORTELLI e PIERANGELI, 2003). Já a dor crônica não possui esta característica protetora, com perda de função biológica, gerando mecanismos de adaptação que induzem à incapacidade e a repercussões biopsicossociais desfavoráveis (TEIXEIRA, 2006) e se caracteriza pela natureza multidimensional, com fenômenos neurofisiológicos, bem como associada aos aspectos psicológicos, cognitivos, comportamentais, sociais e familiares, os quais podem modular a experiência dolorosa (LOESER e MELZACK, 1999).

Embora, muitas vezes, seja possível definir a causa fisiológica para a dor, a estimulação de receptores periféricos denominados nociceptores, os indivíduos reagem de forma diferente diante uma estimulação nociceptiva, ou seja, estímulos que em algumas pessoas provocam dor podem passar quase despercebidos em outras. Além disso, o mesmo estímulo pode causar diferentes níveis de dor no mesmo indivíduo. A relação entre a intensidade da dor percebida e a intensidade do estímulo nociceptivo, portanto, não é sempre proporcional. Essa relação depende de variáveis como a ocorrência de outros estímulos somáticos e de fatores psicológicos como excitação, atenção e expectativa.

3. *Modulação Nociceptiva*

A dor não é simplesmente uma série de aferências entre a periferia e o SNC, mas é uma rede sujeita a alterações, modulações e plasticidades que podem modificar a ênfase de mensagens sensoriais de maneira complexa. O mecanismo mais importante para explicar as diferenças entre a intensidade do estímulo nocivo e a intensidade da dor percebida pelo organismo é a existência de sistemas endógenos de modulação. Encontram-se na literatura evidências de sistemas descendentes de modulação da dor desde a década de 1960. Em 1965, Melzack e Wall propuseram a Teoria da Comporta, em que sinais centrais vindos do encefálo poderiam influenciar os impulsos aferentes nas primeiras sinapses na medula espinhal. Atualmente sabe-se que existem diversas estruturas e vias encefálicas envolvidas na modulação da dor.

Segundo Basbaum e Fields (1978), a antinocicepção pode ser definida como redução na resposta do sistema sensorial para os estímulos nocivos. A sensação nociceptiva e os aspectos das respostas comportamentais da dor dependem do processamento neural de estímulos nocivos por estruturas encefálicas. Assim, no corno dorsal da medula espinal a informação nociceptiva de vísceras, pele e outros órgãos, passa por diversos mecanismos de processamento, alguns dos quais aumentam e outros inibem essa transferência de informação sensorial para outras estruturas do SNC. Neste aspecto, uma rede de vias descendentes projeta-se de estruturas encefálicas a sítios espinhais para desempenhar papel complexo e crucial (CASEY, 1999). Desta forma, a transmissão nociceptiva da medula espinal ou do núcleo espinal do trigêmeo é regulada por neurônios descendentes originados de diversas redes neurais encefálicas. Os corpos neuronais das fibras que formam esse sistema de controle inibitório descendente estão localizados em diferentes núcleos, incluindo a substância cinzenta periaquedutal (SCP), o núcleo magno da rafe, a formação reticular mesencefálica, o núcleo dorsal da rafe (PRADO e FAGANELLO, 2000), o núcleo reticular paragigantocelular, o locus coeruleus, o bulbo ventromedial rostral, a amígdala, o hipotálamo, o tálamo, o córtex somatossensorial e vários outros componentes do sistema límbico (WILLIS e WESTLUND, 1997). Estes sítios compreendem um sistema interconectado anatômica e fisiologicamente que medeia respostas antinociceptivas por meio de interações regionais (BODNAR, 2000).

As vias descendentes de modulação podem agir para inibir ou facilitar a transmissão da informação dolorosa (MILLAN, 2002), ou seja, além do sistema inibitório descendente da dor, nos últimos anos crescem as evidências que demonstram a existência de um sistema facilitatório da nocicepção. Portanto, o sistema modulador parece exercer controle bidirecional, de modo que essa via é prontamente recrutada para suprimir respostas a estímulos nociceptivos em circunstâncias caracterizadas por ameaça de injúria ou de extremo estresse (BOLLES e FANSELOW, 1980), mas também contribui para aumentar a resposta nociceptiva em uma variedade de condições, incluindo a estimulação nociva prolongada, inflamação e injúria de nervos. Na verdade, é possível que as mesmas estruturas encefálicas estejam envolvidas na modulação facilitatória e inibitória da dor (HEINRICHER e INGRAM, 2008). Algumas dessas vias são tonicamente ativas, mas o balanço entre a inibição e facilitação é dinâmico, e pode ser alterado em diferentes estados comportamentais, emocionais e patológicos. Esse sistema de modulação recebe impulsos diretos e indiretos de vias envolvidas com a transmissão nociceptiva, conecta-se com o hipotálamo e estruturas límbicas, incluindo amígdala, córtex cingulado anterior e insula anterior e propicia um mecanismo, através do qual, fatores mais relevantes, como medo, atenção e expectativa podem regular o processamento da dor (FIELDS e cols., 2006; PRADO e FAGANELLO, 2000).

Os circuitos modulatórios exercem importante função na dor crônica ou persistente. Estudos prévios estudaram o envolvimento desses circuitos neurais, e demonstraram a grande plasticidade das vias descendentes envolvidas no desenvolvimento da dor persistente após lesão tecidual ou de nervo (PORRECA e cols., 2002; REN e DUBNER, 2002). Além disso, a relação entre o estímulo nocivo e a sensação dolorosa depende de fatores, tais como o ambiente em que o estímulo acontece, bem como estado psicológico e emocional do indivíduo (BEE e DICKENSON, 2009). Dentro desta perspectiva, Bolles e Fanselow (1980) propuseram um circuito neural onde os sistemas motivacionais de dor e de medo interagem entre si. Esse modelo sugere que o medo pode inibir o sistema motivacional de dor para que esse não interfira no sucesso da fuga, quando respostas de defesa forem solicitadas. De fato, um importante componente da resposta do organismo frente a situações de emergência é a redução da capacidade de perceber estímulos dolorosos. Vários estudos têm mostrado que o sistema antinociceptivo pode ser ativado por diferentes estímulos nociceptivos, exercendo importante função no controle de comportamentos defensivos e afetivos (FANSELOW, 1991; FARDIN e cols., 1984). Também o medo, induzido por estímulos aversivos condicionados e incondicionados, é capaz de inibir respostas comportamentais de dor (LEITE-PANISSI e cols., 2001; CORNÉLIO e NUNES-DE-SOUZA, 2009; CASTILHO e cols., 2002).

Existem vários outros fatores psicológicos que podem contribuir para as diferenças na percepção da dor, dentre eles destaca-se o estresse que afeta grande parcela da população em nossa sociedade moderna.

4. *Estresse e Modulação da Dor*

O conceito de estresse foi introduzido por Hans Selye em 1936, expressando o processo de adaptação realizado pelo organismo ao enfrentar situações percebidas como ameaçadoras à sua vida e ao seu equilíbrio interior. Atualmente acredita-se que o estresse é a soma das reações biológicas a qualquer estímulo adverso físico, mental, emocional, interno ou externo que tende a perturbar a homeostase do organismo. Estas reações compensatórias adequadas ou inadequadas podem levar às desordens funcionais (LIPP, 2003; CAMELO e ANGERAMI, 2004). A resposta de um organismo ao estresse é resultado da interação entre as características pessoais e as demandas do meio, ou seja, as discrepâncias entre o meio externo e interno e a percepção do indivíduo quanto a sua capacidade de resposta (TEIXEIRA e cols., 2000; MILLAN e cols., 1980). O estresse influencia o sistema nociceptivo modulando circuitos neurais do sistema nervoso central, possivelmente alterando o controle nociceptivo descendente (PORRECA e cols., 2002; REN e DUBNER, 2002). Acredita-se que o balanço entre mecanismos descendentes inibitórios e facilitatórios nos circuitos nociceptivos espinhais é finamente modulado pelo estresse (IMBE e cols., 2010; RIVAT e cols., 2010). De fato, a exposição aguda a uma variedade de estímulos estressores pode produzir analgesia em testes

nociceptivos (VACCARINO e KASTIN, 2001), sugerindo que o estresse, de maneira geral, promove atenuação da sensibilidade dolorosa (MOUSA e cols., 1981; WILLER e cols., 1981; JORUM, 1988). A analgesia induzida pelo estresse tem duração variável, de minutos a horas, de acordo com a característica do agente estressante, de sua severidade e dos métodos utilizados para avaliar a analgesia (DUBUISSON e DENNIS, 1977). Com base na literatura, a terminologia “analgesia induzida pelo estresse” é repleta de informações que parecem ser contraditórias ou indicativas dos diferentes mecanismos que promovem analgesia (ABBOTT e cols., 1982). Assim, a diminuição da sensibilidade dolorosa pode ser explicada pela existência de múltiplos mecanismos analgésicos, cuja ativação depende tanto do estímulo quanto da intensidade ou duração, bem como da região do corpo onde o estímulo nociceptivo é aplicado (CURZON e cols., 1997).

Em contrapartida, evidências sugerem que o estresse crônico pode não interferir na percepção dolorosa pelo fato de ocorrer um processo adaptativo ao estímulo estressante, ou ainda pode promover hipernocicepção, causando hiperalgesia e alodinia (TERMAN e cols., 1986; GAMARO e cols., 1998). Além disso, foi proposto que o estado de ansiedade pode aumentar a dor por meio da liberação de catecolaminas, pela sensibilização periférica ou pela estimulação direta dos nociceptores (CHAPMAN e TURNER, 1986).

Além de atuar alterando as vias de modulação da dor, situações de estresse podem diminuir o limiar nociceptivo mecânico, aumentar do número de potenciais de ação produzido em resposta a um estímulo prolongado, e aumentar a velocidade de condução dos nociceptores musculares (CHEN e cols., 2011). O estresse psicológico produzido por restrição hídrica induziu pronunciada hiperalgesia mecânica nos músculos esqueléticos. Essas evidências sugerem que as alterações no funcionamento dos nociceptores aferentes primários dos músculos esqueléticos produzidas por situações de estresse crônico são importantes para promover hiperalgesia mecânica musculoesquelética em ratos (CHEN e cols., 2011). De fato, estudos demonstram que em determinadas condições experimentais, tanto estresse agudo como crônico, podem resultar em hiperalgesia (QUINTERO e cols., 2003; IMBE e cols., 2004). Assim, estudos prévios demonstram que uma hora de restrição física por dia, durante 40 dias, produziu hiperalgesia térmica, a qual persiste por pelo menos 28 dias após a suspensão do estresse crônico (TORRES e cols., 2003b). Neste modelo experimental de estresse crônico, a administração de formalina 1,5% na região da ATM de ratos promoveu aumento de comportamentos nociceptivos depois de repetidos procedimentos de estresse de restrição (GAMEIRO e cols., 2005), demonstrando hiperalgesia.

É importante ressaltar que situações de estresse promovem uma série de mudanças fisiológicas e comportamentais que podem alterar os sistemas hormonais e de neurotransmissores provocando respostas distintas em um mesmo indivíduo a cada nova situação (TORRES e cols., 2003a). A modulação nociceptiva induzida pelo estresse inclui alterações nos sistemas opioide

(YAMADA e NABESHIMA, 1995), serotoninérgico (QUINTERO e cols., 2000), adenosinérgico (TORRES e cols., 2003a) e noradrenérgico (WATKINS e MAYER, 1982). Evidências demonstram que o estresse crônico pode atuar facilitando a transmissão da informação nociceptiva em modelos animais (IMBE e cols., 2004; IMBE e cols., 2010), bem como em pacientes com dor crônica (KARP e cols., 2008).

Considerando o circuito neural envolvido na modulação nociceptiva, o bulbo ventromedial rostral (RVM), incluindo o núcleo magno da rafe, e o locus coeruleus desempenham papel crucial no sistema descendente de modulação da dor (BASBAUM e FIELDS, 1984; REN e DUBNER, 2002). Em particular, é possível que o estresse crônico repetido, por restrição física, diminui a EKR fosforilada (proteína quinase sinalizadora) no locus coeruleus, inibindo a ativação da via descendente inibitória noradrenérgica (IMBE e cols., 2006). Além disso, o estresse crônico induziu aumento da EKR no RVM, resultando em maior ativação de neurônios serotoninérgicos os quais estão correlacionados com a modulação nociceptiva (WOOD e RUSSO, 2001). Por sua vez, as vias descendentes serotoninérgicas exercem controle bidirecional na nocicepção (REN e DUBNER, 2002), sendo os efeitos facilitatórios promovidos pela sensibilização central de neurônios da medula espinhal via receptores 5HT₃ (SUZUKI e cols., 2001).

Por outro lado, estudo de Gameiro e cols. (2006b) demonstrou que a administração i.p. de fluoxetina, um inibidor seletivo da recaptação de serotonina, 30 minutos antes da administração de formalina 1,5 % na ATM esquerda de ratos promoveu efeito analgésico. Em adição, a imipramina, um antidepressivo tricíclico, inibidor da recaptação de serotonina e adrenalina, é amplamente utilizado para controle da dor crônica (MAGNI, 1991). De fato, a administração repetida de imipramina reduziu significativamente a hiperalgesia térmica e preveniu comportamentos de ansiedade relacionados a situações de dor crônica (MATSUZAWA-YANAGIDA e cols., 2008). Este achado corrobora estudo anterior que demonstrou potente efeito antinociceptivo no teste de formalina em ratos portadores de dor crônica (MOCHIZUCKI, 2004).

Além de alterações nos sistemas de neurotransmissores, o estresse promove alterações também na ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA, BODNAR e cols., 1979). Estudos evidenciaram a presença de altos níveis de cortisol em pacientes portadores de dor orofacial, sendo estes índices mais altos dos que os encontrados em pacientes com depressão e fibromialgia, e de pacientes portadores de dores musculares generalizadas (KORZUN e cols., 2002; KLIERMAN e cols., 2001). Dessa forma, é possível que a dor da região orofacial seja um estímulo mais intenso para ativação do eixo HPA do que dor em outras regiões do corpo. Assim, sugere-se que pacientes com DTM possuam hiperatividade do eixo HPA (GAMEIRO e cols., 2006a). Considerando que a dor é um forte estímulo ativador do eixo HPA (PACAK e PALKOVITS, 2001), é possível que os altos níveis de cortisol encontrados na urina de pacientes com DTM representem a resposta

fisiológica ao estresse crônico, devido a presença da dor (GEISLER, 1985). Assim, a dor atuaria como potente estressor associada ao aumento crônico do fator liberador de corticotropina (CRF) ou outros mediadores centrais do eixo HPA (GEISLER, 1985). Ainda, a ativação aumentada de componentes centrais do eixo HPA pode resultar em hiperalgesia (ROVERONI e cols., 2001).

5. *Fator Liberador de Corticotropina*

Estudos demonstram que o CRF e seus receptores medeiam respostas comportamentais, endócrinas e autonômicas para o estresse (DUNN e BERRIDGE, 1990). A cronicidade do estresse pode levar a respostas adaptativas alteradas, as quais podem resultar em síndromes psiquiátricas, como as desordens da ansiedade e da depressão (SHEKHAR e cols., 2005), sendo assim, o aumento na produção e liberação de CRF neuronal pode estar presente em diferentes doenças psiquiátricas, alterações gastrointestinal, cardiovascular, metabólica e reprodutiva atribuídas ao estresse (HABIB e cols., 2001).

Em 1981, o isolamento e a caracterização do CRF (VALE e cols., 1981) foram responsáveis por grande avanço no entendimento das respostas de estresse. Atualmente, um conjunto de considerações sugere que peptídeo CRF, bem como a urocortina, um peptídeo endógeno que apresenta homologia com os peptídeos da família do CRF, atuem de maneira distinta na geração de respostas de estresses por meio dos receptores CRF₁ e CRF₂, os quais são diferentemente expressados em neurônios encefálicos, localizados no neocórtex, regiões límbicas e no tronco encefálico (CHEN e cols., 1993; PERRIN e cols., 1995). Ambos receptores, CRF₁ e CRF₂, pertencem à classe B das superfamílias dos receptores com sete alças transmembrana que sinalizam o acoplamento da proteína G. Desta forma, está estabelecido que a ligação de agonistas dos receptores CRF na dominância extracelular dos receptores CRF₁ e CRF₂ promovem transformação na forma dos receptores, levando-os a um estado ativo, aumentando sua afinidade a proteína Gs (estimuladora) que leva a estimulação da adenilato ciclase com ativação da proteína quinase-A (PKA) e outras vias envolvendo ativação de AMPc, produzindo fosforilação de proteínas e transcrição de genes entre outros efeitos (HAUGER e DAUTZENBERG, 1999).

Os receptores CRF₁ e CRF₂ possuem 71 % de similaridade na sequência de aminoácidos, entretanto, são distintos quanto suas localizações no sistema nervoso central (SNC). Os receptores CRF₁ são amplamente expressos no encéfalo de mamíferos e na hipófise. Especificamente, alta densidade de RNAm para o receptor CRF₁ tem sido encontrada na hipófise anterior, córtex cerebral, cerebelo, amígdala, hipocampo, bulbo olfatório, núcleo parabraquial e núcleos de nervos craniais como o oculomotor, hipoglosso e trigêmio (SOUZA e cols., 1985; SANCHEZ e cols., 1999). Ainda, esses receptores encontram-se em maior número durante a inflamação (UZUKI e cols.,

2001). Os receptores CRF₂ são encontrados predominantemente no septo lateral, hipotálamo ventromedial e plexo coróide (POTTER e cols., 1994).

Em situações de estresse, CRF endógeno é liberado por terminações neuronais em diversas regiões do SNC, como amígdala e hipotálamo. O complexo amigdalóide, em particular, apresenta alta concentração de receptores CRF e é a região extra hipotalâmica que possui a maior concentração de neurônios contendo esse peptídeo (SKORZEWSKA e cols., 2008). Estudo de Souza e cols., (1985) demonstrou que enquanto o núcleo basolateral da amígdala (BLA) apresenta alta concentração de receptores para CRF e baixa imunorreatividade ao peptídeo CRF, o núcleo central da amígdala (CEA) possui alta imunorreatividade ao CRF, mas baixa concentração de receptores para esse peptídeo (SOUZA e cols., 1985). Durante períodos de estresse, o aumento da liberação de CRF na amígdala, e a ativação de receptores locais, medeiam alterações comportamentais e autonômicas (KOOB e HEINRICH, 1999). De fato, alguns trabalhos sugerem que o CEA participa da alteração da atividade basal autonômica em resposta ao estresse (FOLKOW e cols., 1982; GALENO e cols., 1984). Estudos neuroanatômicos mostraram a existência de uma conexão recíproca entre o CEA e os núcleos do tronco encefálico envolvidos no controle da atividade autonômica (VEENING e cols., 1984), dentre eles a área parabraquial (SCHWABER e cols., 1988), o núcleo do trato solitário (ZARDETTO-SMITH e GRAY, 1990) e o complexo dorso vagal (DANIELSEN e cols., 1989).

Além das alterações comportamentais promovidas pelo CRF, tem sido demonstrado o envolvimento deste peptídeo em outras funções, tal como a nocicepção. Desta maneira, a ativação de receptores CRF pode ser fundamental na modulação da nocicepção (CUI e cols., 2004). Estudos têm mostrado que a administração intracerebroventricular de CRF induz efeitos antinociceptivos em ratos submetidos ao teste de formalina (LARIVIERE e MELZACK, 2000) e no teste de placa quente (BIANCHI e PANERAI, 1995). Em estudo de Cui e cols. (2004), o limiar nociceptivo de ambos os estímulos nocivos, térmico e mecânico, aumentou significativamente após administração de CRF no CEA. Estes autores sugeriram que este efeito antinociceptivo pode ter sido mediado por receptores CRF₁, e que a ativação destes, leva a ativação de projeções eferentes do CEA para a substância cinzenta periaquedutal, estrutura conhecida por ser parte das vias inibitórias descendentes para a coluna dorsal da medula espinhal (FIELDS e BASBAUM, 1994; MILLAN, 1999). Estudo recente de Donatti e Leite-Panissi (2013) corrobora estes achados prévios, e demonstraram que a administração de CRF no CEA promoveu antinocicepção no teste de placa quente em cobaias. Em adição, Poree e cols. (1989) investigaram o efeito da administração intravenosa de CRF, nas respostas de neurônios trigeminais à estímulos térmicos nocivos e verificaram inibição dos potenciais de ação, sugerindo propriedade antinociceptiva periférica.

O mecanismo através do qual o CRF promove antinocicepção ainda não é completamente entendido. Efeitos analgésicos induzidos pela administração central ou periférica de CRF podem ser mediados por mecanismos opióides (HARGREAVES e cols., 1990; SONG e TAKEMORI, 1990) ou não opióides (CEPEDA e cols., 2004). É possível que os efeitos analgésicos sejam mediados por mecanismos não opióides associados a liberação de glicocorticóides endógenos em resposta à administração central de CRF (YARUSHKINA e cols., 2011). Porém, evidências sugerem que os glicocorticóides participariam da analgesia induzida pelo CRF apenas frente à estímulos mecânicos e não térmicos (VIT e cols., 2006). De fato, estudo de Poree e cols. (1989) demonstrou que os efeitos antinociceptivos promovidos pelo CRF à estímulos térmicos nocivos não foram revertidos em animais que tiveram as glândulas hipófise e adrenal previamente removidas. Dessa forma, estudos complementares são necessários para compreender a ação do CRF na modulação da informação nociceptiva.

II. OBJETIVOS

Fundamentado na literatura descrita o objetivo deste trabalho foi avaliar a nocicepção e o comportamento emocional em ratos portadores de inflamação persistente na articulação temporomandibular (ATM), induzida por administração de adjuvante completo de Freund (CFA) em diferentes situações de estresse (agudo, crônico repetido e variado). Ainda, investigou-se o possível envolvimento de receptores CRF do núcleo central da amígdala na modulação nociceptiva de ratos portadores de inflamação persistente das ATMS,

Para isso este trabalho apresenta os seguintes objetivos específicos:

1. Verificar se a inflamação persistente da ATM em ratos altera a sensibilidade mecânica orofacial (avaliada pelo limiar de retirada à estímulo mecânico inócuo), a sensibilidade nociceptiva secundária, por meio do teste da placa quente, e o comportamento emocional pela exposição ao teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE).
2. Avaliar o efeito do estresse agudo e crônico (repetido e variado) na sensibilidade mecânica orofacial, na sensibilidade nociceptiva secundária (teste de placa quente), e no comportamento emocional em ratos com a inflamação persistente da ATM.
3. Analisar se o tratamento com um antidepressivo tricíclico (inibidor da recaptação de catecolaminas), imipramina, por 5 dias, é capaz de promover alteração da sensibilidade mecânica orofacial (por meio da avaliação do limiar de retirada frente à estímulo mecânico inócuo), da sensibilidade nociceptiva secundária (por meio do teste da placa quente) e do comportamento emocional no teste do LCE.
4. Avaliar se a administração de agonista e antagonista para receptores CRF no núcleo central da amígdala promove alteração da sensibilidade nociceptiva secundária em ratos com inflamação persistente da ATM.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar (250 a 300 gramas, $n = 113$) cedidos pelo Biotério Central do *Campus* de Ribeirão Preto. Os ratos foram mantidos em caixas acrílicas coletivas (4 animais por caixa) com 1394 cm² de área de piso, em ambiente com temperatura controlada ($24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) e ciclo claro-escuro de 12 horas (ciclo claro se iniciando às 7 horas), com água (de acordo com o protocolo) 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 Legislação Brasileira vigente, e foram aprovados pela Comissão de Ética para o Uso de Animais da Prefeitura do *Campus* Administrativo de Ribeirão Preto/USP Processo no. 2009.1.592.53.6.

2. Indução de Inflamação na ATM

Os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina 10 % (75 mg/kg) associado a xilazina 4 % (10 mg/kg) e receberam a injeção de Adjuvante Completo de Freund (CFA, F5881, Sigma, St Louis) em suspensão (óleo/salina 1:1) num volume total de 50 μL ou de solução salina 0,9 % na região das ATMs bilateralmente. Para a injeção foi utilizada uma seringa de 1 mL graduada em 0,01 mL e uma agulha fina 30½ G (30 x 13 mm). Para localização das ATMs foi realizada a palpação do arco zigomático e do côndilo para identificação do local correto da injeção. A agulha foi inserida na região imediatamente inferior à borda posteroinferior do arco zigomático e avançada em direção anterior até entrar em contato com a borda posterolateral do côndilo (ZHOU e cols., 1999) (Figura 1).

Figura 1: Fotografia ilustrando a aplicação de solução salina 0,9 % ou adjuvante completo de Freund (CFA, 50 μL) na articulação temporomandibular (ATM) de um animal experimental. Fonte: arquivo pessoal.

3. Avaliação da Sensibilidade Mecânica Orofacial

Para avaliação da sensibilidade mecânica orofacial, foi avaliado 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, SP, Brasil), o qual faz uso de um filamento com aumento progressivo de força (em gramas). Este estímulo foi aplicado antes e 15 dias após a indução ou não da inflamação persistente nas ATMs (Figura 2). O limiar de retirada da cabeça foi avaliado em gramas. Para realização dos testes os animais foram mantidos individualmente em uma caixa acrílica sem restrição de movimentos por 20 minutos, inicialmente para habituação. Após este período foram levemente restritos e o estímulo foi aplicado na face lateral 2 mm abaixo da borda posterior do arco zigomático. Foram realizadas 3 medidas de limiar em cada sessão teste, 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 anestesiometro modelo Von Frey. Fonte: arquivo pessoal.

4. Teste de Placa Quente

O aparelho utilizado consistiu de uma placa quente de alumínio a $48 \pm 0,5$ °C com uma cuba de acrílico removível medindo 28 cm de altura, 26 cm de comprimento e 18 cm de largura, onde os animais foram colocados (Figura 3). O parâmetro de observação foi o registro do tempo de latência de lambidas em um dos membros posteriores ou saltos, sendo que o tempo de corte para este teste foi padronizado em 30 segundos, para evitar possíveis danos teciduais.

Inicialmente foi realizada a latência basal. Após esse procedimento os animais foram submetidos aos procedimentos experimentais de administração de CFA ou solução salina nas ATMs. Após um período de 15 dias foi avaliada a nocicepção durante 60 minutos, em intervalos aleatórios. Para latência basal foi considerada uma média de três medidas obtidas.

Figura 3: Fotografia do aparato utilizado para avaliação da nocicepção térmica. Fonte: arquivo pessoal.

5. *Labirinto em Cruz Elevado*

O Labirinto em Cruz Elevado (LCE) é constituído de dois braços abertos (50 x 10 cm) perpendiculares a dois braços fechados de mesma medida, mas circundados por paredes elevadas (40 cm de altura). Todo o aparato encontra-se elevado 50 cm do solo (PELLOW e cols., 1985, Figura 4).

A atividade exploratória do animal no LCE foi avaliada individualmente, segundo os seguintes parâmetros tradicionais:

- Número de entradas nos braços abertos: números de vezes que o animal atravessa com as quatro patas para o interior desses braços;
- Número de entradas nos braços fechados: número de vezes que o animal atravessa com as quatro patas para o interior desses braços;
- Percentual de tempo nos braços abertos: foi obtido através da relação entre o tempo gasto nos braços abertos do labirinto pelo tempo total do teste (5 min).

$$\% \text{ Tempo} = \frac{100 \times \text{Tempo nos BA}}{\text{Tempo total do teste}}$$

As sessões do teste no LCE foram filmadas com a utilização do programa *The Observer*. O teste do LCE tem a duração de 5 minutos.

Figura 4: Fotografia do aparato utilizado no teste do labirinto em cruz elevado (LCE). Fonte: arquivo pessoal.

6. *Estresse Agudo*

O estresse agudo foi realizado em laboratório, utilizando um aparato metálico, de 20 cm de comprimento e diâmetro ajustável. O aparato metálico possui ventilação adequada ao longo do seu comprimento, e as suas extremidades fechadas, não permitindo que o animal se movimente, ficando em situação de restrição física (Figura 5). Para a realização do estresse agudo, o animal foi submetido a 2 horas de restrição.

Figura 5: Fotografia do aparato utilizado para realização do estresse de restrição. Fonte: arquivo pessoal.

7. *Estresse Crônico*

O estresse crônico foi dividido em dois protocolos distintos: repetitivo e variado. No protocolo de estresse repetitivo, os ratos permaneceram em restrição física 2 horas por dia durante 10 dias. Para o estresse crônico variado foram realizadas 5 metodologias diferentes reproduzidas duas vezes cada uma, porém não de forma consecutiva (protocolos adaptados de SHI e cols., 2010 e WILLNER e cols., 1987). As situações estressoras foram as seguintes:

- Agitação: os ratos foram colocados individualmente em uma caixa sobre uma mesa agitadora durante 15 minutos.
- Nado Forçado: foi realizado em um tanque metálico quadrado com 50 cm de altura e 35 cm de lado, preenchido com água até uma altura de 22 cm, evitando o contato do animal com o chão ou com a borda superior quando este permanece em livre movimentação na posição vertical. A temperatura da água foi controlada e mantida a $25 \pm 1^\circ\text{C}$. O tempo deste procedimento foi de 15 minutos.
- Restrição Forçada: foi realizada em aparato metálico ventilados como descrito anteriormente, pelo período de 2 horas.
- Exposição ao frio: ratos foram expostos à temperatura de 10°C , estando em caixas plásticas individuais, pelo período de 30 minutos.
- Privação de Água: foi removido o bebedouro por 24 horas.

Figura 6: Fotografia dos procedimentos de estresse variado. A; Estresse de Restrição; B: Nado Forçado; C: Estresse por agitação; D: Estresse por exposição ao frio. Fonte: arquivo pessoal.

8. Verificação e quantificação do extravasamento plasmático na ATM

No final de cada experimento, os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina 10 % (75 mg/kg) associado à xilazina 4 % (10 mg/kg) para administração do corante Azul de Evans (0,1%, 5 mg/kg, Sigma Chemicals, via veia peniana) para confirmar o acerto do local da injeção de CFA na região das ATMs pelo exame visual do extravasamento plasmático em *postmortem* (HASS

e cols., 1992). Em resumo, o corante liga-se a proteínas plasmáticas, as quais são utilizadas como marcadores de extravasamento plasmático. Após 45 minutos da injeção do corante, os animais foram anestesiados profundamente com sobredose da mesma associação anestésica (cloridrato de cetamina 10 % 225 mg/kg associado à xilazina 4 % 30 mg/kg) e a região da ATM foi analisada cuidadosamente com microscópio de dissecação para a avaliação do local da injeção.

Ainda, para quantificação do extravasamento plasmático na ATM, após a sobredose anestésica, os animais do Protocolo 1 (descritos a seguir), foram submetidos a eutanásia por meio do rompimento do diafragma, seguida da perfusão transcardíaca com salina tamponada (PBS; 0,05 M, pH = 7,4). Em seguida, os tecidos articulares foram dissecados para padronizar o tamanho (30 ± 2 mg) e armazenados a -20°C até a análise. O corante foi extraído pela imersão das amostras em 1 mL de formamida a 60°C por 24 horas. A quantia de corante azul nas amostras de tecido foi determinada usando um espectrofotômetro que mede a absorbância da solução de formamida ($\lambda = 620$ nm). A concentração do corante foi calculada por grama de tecido.

9. Dosagem de Corticosterona

Para avaliar se os protocolos de estresse promovem ativação do eixo HPA, foi realizado neste estudo a dosagem da corticosterona plasmática. Para a análise da dosagem da corticosterona plasmática nas condições experimentais, seis ratos de cada subgrupo experimental foram selecionados aleatoriamente e o sangue coletado por meio de decapitação sem anestesia prévia para que não houvesse interferência na dosagem. Após sua obtenção, o sangue foi centrifugado por 20 minutos à 4°C com velocidade de 3500 rpm, e 2000 μL do componente plasmático (sobrenadante) coletado. Deste plasma coletado, 50 μL foi processado pelo método Luminex® 200™ System, que consiste na identificação de microesferas coradas por fluoróforos (VEINALDE e cols., 2013). Por meio do imunoensaio, anticorpos de captura localizados na superfície da microesfera são detectados por um marcador fluorescente, a ficoeritrina (PE) e feixes de dois lasers diferentes detectam a microesfera e quantificam o sinal de reporte em cada uma.

10. Procedimento Cirúrgico

Inicialmente, os ratos foram anestesiados com uma injeção intramuscular da associação de cloridrato de cetamina 10 % (75 mg/kg) e xilazina 4 % (10 mg/kg). Em seguida, foram colocados em um aparelho estereotáxico (Insight Ltda, Brasil) tendo a cabeça fixada por meio de duas barras auriculares e de um suporte bucal. A peça bucal do exterotáxico permaneceu abaixo do plano horizontal por 21,4 mm em relação ao ducto auricular, sendo considerado de 14,4 mm a distância do ducto ao bregma. Foi injetado, subcutaneamente, 0,2 mL de xilocaína a 2 % e felinefrina a 0,04

%, na região do escalpo a ser aberta, para reduzir a sensibilidade dolorosa e o sangramento no local. Foi realizada assepsia da pele após tricotomia, com álcool iodado e após esses procedimentos foi realizada uma incisão longitudinal na pele da cabeça e no tecido subcutâneo. A calota craniana foi exposta e efetuada nova assepsia da região com água oxigenada 10 vol. e merthiolate. Após a exposição da calota craniana foram realizados dois orifícios com auxílio de um motor elétrico de baixa rotação e de uma fresa odontológica esférica de aço inoxidável número 4 (carbide). Em um orifício foi rosqueado um pequeno parafuso com a finalidade de servir de apoio para o capacete de acrílico, confeccionado com resina autopolimerizável (Simplex, Dental Fillings), o outro orifício permitiu a introdução da cânula guia nas regiões pré-estabelecidas por meio do uso das coordenadas esterotáxicas do Atlas de Swanson (1992) para ratos.

Após a completa polimerização do acrílico, removeu-se o suporte de apoio da cânula guia acoplada a torre do esterotáxico, e colocou-se na mesma, já fixada, um mandril oclisor de aço inoxidável com 0,2 mm de diâmetro e do mesmo comprimento da cânula guia, para evitar uma possível obstrução.

Trinta minutos antes do início da cirurgia, os animais receberam, via subcutânea, 1 mL/Kg de flunixin meglumine 1 % (Banamine Schering-Plough SA, RJ), um antiinflamatório, antipirético e analgésico de longa duração, para contribuir com a recuperação pós-cirúrgica e 0,3 mL/kg de Pentabiótico veterinário pequeno porte (Fort Dodge).

11. Cânula guia e microinjeção

As cânulas guias foram confeccionadas a partir de segmentos de agulhas hipodérmicas de aço inoxidável com 0,6 mm de diâmetro externo e 14 mm de comprimento. O implante foi realizado no hemisfério esquerdo unilateral, e as coordenadas utilizadas foram de acordo com o Atlas de Swanson (1992) para ratos, conforme segue:

Núcleo Central da Amígdala: AP= - 2,3 mm a partir do bregma; L= 4,0 mm a partir da linha média; P= 7,0 mm a partir da calota craniana.

A microinjeção foi realizada com uma seringa Hamilton 10,0 µL (EUA), conectada a uma agulha dental, de 0,3 mm de diâmetro externo e 15 mm de comprimento, por um segmento de polietileno PE-10 de aproximadamente 45 cm. Dessa forma, a agulha alcançou o tecido cerebral, ultrapassando em 1 mm a extremidade inferior da cânula guia. Parte do polietileno foi preenchida com a droga utilizada e a outra parte, com água destilada, com uma bolha de ar separando os dois líquidos. A microinjeção foi realizada sempre no volume de 0,2 µL e durante 60 segundos.

12. Fármacos

Os seguintes fármacos foram utilizados: imipramina (antidepressivo tricíclico, IMI; 15 mg/Kg, i.p.; Sigma, EUA), dissolvida em salina estéril, agonista não específico para os receptores CRF (CRF, C3042 Sigma St. Louis, MO) e antagonista não específico dos receptores CRF (α -h-CRF₉₋₄₁, C246 Sigma St. Louis, MO). A concentração utilizada para o CRF e para o α -h-CRF₉₋₄₁ foi de 1,0 μ g/0,2 μ L, de acordo com estudo de prévio de Donatti e Leite-Panissi (2013).

13. Histologia

Com o término dos experimentos onde se administrou drogas intracerebral, os ratos foram anestesiados com sobredose da associação de cloridrato de cetamina 10 % (225 mg/kg) e xilazina 4% (30 mg/kg) via i.m. e em seguida foi realizado a eutanásia, por meio do rompimento do diafragma seguida de perfusão utilizando uma bomba peristáltica no ventrículo esquerdo cardíaco com solução fisiológica de 0,9 % para remoção do sangue e após com formol a 10 % para a fixação dos tecidos. Os encéfalos dos ratos foram removidos e mantidos em formol 10 % por pelo menos quatro dias. Após este período foram colocados em uma solução de sacarose a 20 % por 48 hs ou até que o material tivesse migrado para o fundo do recipiente, indicando saturação de tecido. Após a crioproteção, os encéfalos foram cortados em micrótomo de congelação (40 μ m; Microm, EUA) e foi realizado o processo histológico utilizando a técnica de coloração com Nissl. As secções foram observadas no microscópio para determinar se as microinjeções alcançaram a estrutura alvo, no caso o núcleo central da amígdala.

14. Protocolos Experimentais

Protocolo 1: Avaliação do estresse agudo, crônico repetido ou crônico variado na resposta nociceptiva aguda e do comportamento emocional em ratos portadores de inflamação persistente nas ATMs induzida por CFA.

Grupo 1 (n = 6, SAL): após a realização da avaliação basal da sensibilidade mecânica orofacial e do limiar basal à placa quente os ratos receberam injeção de 50 μ L de solução salina na região das ATMs bilateralmente. Após 15 dias avaliou-se novamente a sensibilidade mecânica orofacial e os ratos foram submetidos ao teste de placa quente durante 60 minutos, em intervalos aleatórios. Vinte e quatro horas depois do teste de placa quente, realizou-se o teste do LCE.

Grupo 2 (n = 6, CFA): após a realização da avaliação basal da sensibilidade mecânica orofacial e do limiar basal à placa quente os ratos receberam injeção de 50 μ L de Adjuvante Completo de Freund (CFA) em suspensão (óleo/salina 1:1) na região das ATMs bilateralmente.

Após 15 dias avaliou-se novamente submetidos a sensibilidade mecânica orofacial e realizou-se o teste de placa quente durante 60 minutos, em intervalos aleatórios. Vinte e quatro horas depois do teste de placa quente, realizou-se o teste do LCE.

Grupo 3 (n = 6, SAL+EA): após a realização da avaliação basal da sensibilidade mecânica orofacial e do limiar à placa quente os ratos receberam injeção de solução salina na região das ATMs bilateralmente. No 15º dia esses animais foram submetidos a estresse de restrição agudo (2 horas de restrição) e em seguida foram submetidos ao teste de sensibilidade mecânica orofacial (avaliação do limiar de retirada frente à estímulo inócuo mecânico) e ao teste de placa quente durante 60 minutos, em intervalos aleatórios. Vinte e quatro horas depois do teste de placa quente, realizou-se o teste do LCE.

Grupo 4 (n = 6, CFA+EA): após a realização da avaliação basal da sensibilidade mecânica orofacial e do limiar à placa quente os ratos receberam injeção de CFA na região das ATMs bilateralmente. No 15º dia foram submetidos a estresse de restrição agudo (2 horas de restrição) e em seguida foram submetidos ao teste de sensibilidade mecânica orofacial (avaliação do limiar de retirada frente à estímulo inócuo mecânico) e ao teste de placa quente durante 60 minutos, em intervalos aleatórios. Vinte e quatro horas depois do teste de placa quente, realizou-se o teste do LCE.

Grupo 5 (n = 6, SAL+ECV): após a realização da avaliação basal da sensibilidade mecânica orofacial e do limiar basal à placa quente, os ratos receberam injeção de solução salina na região das ATMs bilateralmente. No 5º dia, esses ratos foram submetidos a estresse crônico variado por 10 dias, sendo novamente submetidos ao teste de sensibilidade mecânica orofacial (avaliação do limiar de retirada frente à estímulo inócuo mecânico) e nociceptiva secundária, por meio do teste de placa quente durante 60 minutos, em intervalos aleatórios. Vinte e quatro horas depois os ratos foram avaliados no LCE.

Grupo 6 (n = 6, CFA+ECV): após a realização da avaliação basal da sensibilidade mecânica orofacial e do limiar basal à placa quente, os ratos receberam injeção de CFA na região das ATMs bilateralmente. No 5º dia, esses ratos foram submetidos a estresse crônico variado por 10 dias, sendo novamente submetidos ao teste de sensibilidade mecânica orofacial (avaliação do limiar de retirada frente à estímulo inócuo mecânico) e nociceptiva secundária, por meio do teste de placa quente durante 60 minutos, em intervalos aleatórios. Vinte e quatro horas depois os ratos foram avaliados no LCE.

Grupo 7 (n = 6, SAL+ECR): após a realização da avaliação basal da sensibilidade mecânica orofacial e do limiar basal à placa quente, os ratos receberam injeção de solução salina na região das ATMs bilateralmente. No 5º dia, esses ratos foram submetidos a estresse de restrição crônico repetido por 10 dias, sendo novamente submetidos ao teste de sensibilidade mecânica orofacial

(avaliação do limiar de retirada frente à estímulo inócuo mecânico) e nociceptiva secundária, por meio do teste de placa quente durante 60 minutos, em intervalos aleatórios. Vinte e quatro horas depois os ratos foram avaliados no LCE.

Grupo 8 (n = 6, CFA+ECR): após a realização da avaliação basal da sensibilidade mecânica orofacial e do limiar basal à placa quente, os ratos receberam injeção de CFA na região das ATMs bilateralmente. No 5º dia, esses ratos foram submetidos a estresse de restrição crônico repetido por 10 dias, sendo novamente submetidos ao teste de sensibilidade mecânica orofacial (avaliação do limiar de retirada frente à estímulo inócuo mecânico) e nociceptiva secundária, por meio do teste de placa quente durante 60 minutos, em intervalos aleatórios. Vinte e quatro horas depois os ratos foram avaliados no LCE.

Protocolo 2: Avaliação do efeito do tratamento sistêmico com inibidor de receptação de serotonina sobre a resposta nociceptiva aguda e sobre o comportamento emocional em ratos portadores de inflamação persistente nas ATMs induzida por CFA.

Grupo 1 (n = 5, SAL+SAL): após a realização da avaliação basal da sensibilidade mecânica orofacial e do limiar à placa quente os ratos desse grupo receberam injeção de 50 µL de solução salina na região das ATMs bilateralmente. No 10º dia experimental receberam injeção do veículo da imipramina (salina esterelizada, 1 mL/Kg, i.p) 2 vezes por dia durante 5 dias. No 15º dia avaliou-se novamente a sensibilidade mecânica orofacial e os ratos foram submetidos ao teste de placa quente durante 60 minutos, em intervalos aleatórios. Vinte e quatro horas depois do teste de placa quente, realizou-se o teste do LCE.

Grupo 2 (n = 6, SAL+IMI): após a realização da avaliação basal da sensibilidade mecânica orofacial e do limiar à placa quente os ratos desse grupo receberam injeção de 50 µL de solução salina na região das ATMs bilateralmente. No 10º dia experimental receberam injeção de imipramina (15 mg/Kg, i.p.) 2 vezes por dia durante 5 dias. No 15º dia avaliou-se novamente a sensibilidade mecânica orofacial e os ratos foram submetidos ao teste de placa quente durante 60 minutos, em intervalos aleatórios. Vinte e quatro horas depois do teste de placa quente, realizou-se o teste do LCE.

Grupo 3 (n = 6, CFA+SAL): após a realização da avaliação basal da sensibilidade mecânica orofacial e do limiar à placa quente os ratos desse grupo receberam injeção de 50 µL de CFA em suspensão (óleo/salina 1:1) na região das ATMs bilateralmente. No 10º dia experimental receberam injeção de imipramina (15 mg/Kg, i.p) 2 vezes por dia durante 5 dias. No 15º dia avaliou-se novamente a sensibilidade mecânica orofacial e os ratos foram submetidos ao teste de placa quente durante 60 minutos, em intervalos aleatórios. Vinte e quatro horas depois do teste de placa quente, realizou-se o teste do LCE.

Grupo 4 (n = 7, CFA+IMI): após a realização da avaliação basal da sensibilidade mecânica orofacial e do limiar à placa quente os ratos desse grupo receberam injeção de 50 µL de CFA em suspensão (óleo/salina 1:1) na região das ATMs bilateralmente. No 10º dia experimental receberam injeção do veículo (salina esterelizada, 1 ml/kg, i.p) 2 vezes por dia durante 5 dias. No 15º dia avaliou-se novamente a sensibilidade mecânica orofacial e os ratos foram submetidos ao teste de placa quente durante 60 minutos, em intervalos aleatórios. Vinte e quatro horas depois do teste de placa quente, realizou-se o teste do LCE.

Protocolo 3: Efeito da administração de agonista e antagonista para receptores CRF no núcleo central da amígdala na sensibilidade nociceptiva em ratos portadores de inflamação persistente das ATMs.

Após o período de recuperação da cirurgia para implante da cânula-guia no CEA (6 dias), foram formados os seguintes grupos experimentais:

Grupo 1 (n = 7, SAL+SAL): após a realização da avaliação basal do limiar à placa quente, ratos desse grupo receberam injeção de 50 µL de solução salina na região das ATMs. No 15º dia os animais receberam microinjeção do veículo (salina esterilizada 0,9%, 0,2 µL) no núcleo central da amígdala e a seguir foram submetidos ao teste de placa quente.

Grupo 2 (n = 7, SAL+CRF): após a realização da avaliação basal do limiar à placa quente, ratos desse grupo receberam injeção de 50 µL de solução salina na região das ATMs. No 15º dia os animais receberam microinjeção do agonista do receptor CRF na dose 1,0 µg/0,2 µL no núcleo central da amígdala e a seguir foram submetidos ao teste de placa quente.

Grupo 3 (n = 6, SAL+α-hCRF): após a realização da avaliação basal do limiar à placa quente, ratos desse grupo receberam injeção de 50 µL de solução salina na região das ATMs. No 15º dia os animais receberam microinjeção do antagonista do receptor CRF na dose 1,0 µg/0,2 µL no núcleo central da amígdala e a seguir foram submetidos ao teste de placa quente.

Grupo 4 (n = 7, CFA+SAL): após a realização da avaliação basal do limiar à placa quente, ratos desse grupo receberam injeção de 50 µL de CFA em suspensão (óleo/salina 1:1) na região das ATMs. No 15º dia os animais receberam microinjeção do veículo (salina esterilizada 0,9%, 0,2 µL) no núcleo central da amígdala e a seguir foram submetidos ao teste de placa quente.

Grupo 5 (n = 7, CFA+CRF): após a realização da avaliação basal do limiar à placa quente, ratos desse grupo receberam injeção de 50 µL de CFA em suspensão (óleo/salina 1:1) na região das ATMs. No 15º dia os animais receberam microinjeção do agonista do receptor CRF na dose 1,0 µg/0,2 µL no núcleo central da amígdala e a seguir foram submetidos ao teste de placa quente.

Grupo 6 (n = 7, CFA+α-hCRF): após a realização da avaliação basal do limiar à placa quente, ratos desse grupo receberam injeção de 50 µL de CFA em suspensão (óleo/salina 1:1) na

região das ATMs. No 15º dia os animais receberam microinjeção do antagonista do receptor CRF (α -hCRF) na dose 1,0 µg/0,2 µL no núcleo central da amígdala e a seguir foram submetidos ao teste de placa quente.

15. Eutanásia

Com o término dos experimentos, todos os animais foram submetidos à eutanásia com sobredose anestésica com a associação de cloridrato de cetamina 10 % (225 mg/kg) e xilasina 4 % (30 mg/kg). Com destaque, de acordo com o protocolo experimental, foi realizada perfusão conforme descrito nos itens 8. Verificação e quantificação do extravasamento plasmático na ATM, e 13. Histologia.

16. Análise dos resultados

Para análise dos resultados do extravasamento plasmático os dados foram serão apresentados em média $\pm$ erro padrão da média de µg/mg de tecido, e foi realizada para avaliação estatística teste T não-pareado, tendo como fatores o tratamento (SAL ou CFA).

A dosagem de corticosterona plasmática será apresentada como média $\pm$ erro padrão da média pg/mL. Para análise estatística foi realizada uma ANOVA de duas vias, sendo considerados como fatores o tratamento (SAL ou CFA) e a condição (sem estresse e com estresse). Como pós-teste foi realizado o teste de Newman-Keuls quando pertinente. Os dados foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

Para análise dos resultados do teste da sensibilidade mecânica orofacial os dados serão apresentados como a média do limiar de retirada $\pm$ erro padrão da média, em gramas, e foram avaliados antes e após os tratamentos, nos diferentes grupos experimentais. Como tratamento estatístico, foi realizado teste T-pareado, sendo os fatores considerados antes e após o tratamento. Os dados foram considerados significativos apenas quando $p < 0,05$.

Os resultados do teste da placa quente foram normalizados de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{IAPQ} = \frac{\text{tempo de latência} - \text{linha de base}}{30 - \text{linha de base}}$$

Onde **IAPQ** representa Índice de Antinocicepção da Placa Quente; o tempo de latência corresponde ao tempo que o animal leva para emitir a resposta após o tratamento experimental, linha de base é a duração da latência no período controle e o valor 30 corresponde ao tempo de corte do estímulo nocivo em segundos.

Para análise estatística foi realizada a análise de variância para medidas repetidas (ANOVA) de duas vias, sendo os fatores considerados o tratamento e o tempo. Como pós-teste foi realizado o teste de Newman-Keuls quando pertinente. Os dados foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

Para a análise estatística dos estudos comportamentais, foram calculadas as médias do número de entradas nos braços abertos e a porcentagem de tempo despendido nos braços abertos (%TBA) em relação ao total. Esta última variável será calculada de acordo com a fórmula a seguir:

$$\%TBA = 100 \times [TA/(TA+TF)], \text{ onde:}$$

TA: tempo despendido nos braços abertos; e

TF: tempo despendido nos braços fechados.

O número total de entradas nos braços fechados foi utilizado como índice geral da atividade exploratória. As médias das variáveis descritas foram analisadas utilizando-se análise de variância (ANOVA) de uma via, considerando-se o fator tratamento. Como pós-teste foi realizado o teste de Newman-Keuls quando pertinente. Os dados foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

Para todas as análise dos dados foi utilizado o programa estatístico SigmaStat 3.1.

IV. RESULTADOS

Para avaliar a inflamação persistente das ATMs dos ratos utilizados neste trabalho, além da avaliação do extravasamento plasmático intra-articular, por meio da microscopia de luz, após a dissecação do local da injeção, foi realizada a quantificação do extravasamento plasmático de ratos portadores (CFA) ou não (SAL) de inflamação persistente das ATMs. Os resultados mostraram aumento significativo do extravasamento plasmático do corante Azul de Evans ($p < 0,05$, teste t-Student não pareado) nos ratos que receberam CFA intra-articular comparado com os ratos que receberam administração intra-articular de SAL (Figura 7).

Figura 7: Média $\pm$ erro padrão da média do extravasamento plasmático do corante Azul de Evans, 15 dias após a administração de solução salina 0,9 % (SAL, $n = 6$) ou adjuvante completo de Freund (CFA, $n = 6$) bilateralmente na ATM de ratos. * $p < 0,05$, teste t-Student não-pareado.

1. *Protocolo 1: Avaliação do estresse agudo, crônico repetido ou crônico variado na resposta nociceptiva aguda e do comportamento emocional em ratos portadores de inflamação persistente nas ATMs induzida por CFA.*

Dosagem da corticosterona plasmática

Inicialmente, para avaliar a ativação do eixo HPA, nos distintos protocolos, foi quantificada a corticosterona plasmática. Nossos resultados mostraram que o EA aumentou a concentração de corticosterona plasmática (Figura 8). Por outro lado, o ECV não alterou, enquanto que o ECR reduziu a corticosterona plasmática, (Figura 8). A aplicação da ANOVA de duas vias evidenciou diferença estatística no tratamento ($F_{1,47} = 4,15$, $p = 0,048$) e na condição ($F_{1,47} = 236,84$, $p < 0,001$), mas não há interação entre tratamento e condição ($F_{1,47} = 0,63$, $p = 0,59$). O teste *post hoc* de Newman-Keuls revelou diferença quando comparados o grupo dos ratos submetidos ao EA com os demais grupos, tanto nos ratos que receberam administração intra-

articular de SAL quanto de CFA. Ainda, o teste *post hoc* de Newman-Keuls demonstrou diferença significativa quando comparados os ratos do grupo SAL+ EA com CFA+EA ($p < 0,05$, Figura 8). Por fim a dosagem de corticosterona plasmática dos grupos SAL+ECR e CFA+ECR foi diferente dos grupos SAL+ECV e CFA+ECV ($p < 0,05$, Newman-Keuls, Figura 8).

Figura 8: Média $\pm$ erro padrão da média da concentração de corticosterona plasmática (ng/ml) em ratos com (CFA) ou sem (SAL) inflamação persistente das ATMs, submetidos (EA, ECV, ECR) ou não (Controle) a diferentes protocolos de estresse. (a) $p < 0,05$ teste de Newman Keuls quando comparado com os demais grupos, (b) $p < 0,05$ teste de Newman Keuls quando comparado com o grupo SAL+EA, (c) $p < 0,05$ teste de Newman Keuls quando comparado com SAL+ECV e CFA+ECV. EA: estresse agudo; ECV: estresse crônico variado; ECR: estresse crônico repetido. N = 6, para cada grupo experimental.

Sensibilidade mecânica orofacial e Sensibilidade nociceptiva

Com relação à sensibilidade mecânica orofacial, o tratamento com CFA intra-articular (ATMs), bilateralmente, promoveu redução do limiar de retirada em gramas (Figura 9). Além disso, ratos portadores de inflamação persistente das ATMs apresentaram redução do IA (Figura 10). Em adição, o estresse agudo (EA) aumentou o limiar de retirada mecânico em ratos sem inflamação as ATMs (Figura 9) bem como reverteu a redução do limiar de retirada mecânico orofacial induzido pela administração intra-articular de CFA (Figura 9), e impediu a redução do IA, induzida pelo CFA, até os 25 minutos do teste da placa quente (Figura 10B). Considerando a realização dos protocolos de estresse crônico, os resultados mostraram que o estresse crônico repetido (ECR) ou

variado (ECV) não impediram a redução do limiar de retirada frente à estímulo mecânico orofacial induzida pela administração intra-articular de CFA (Figura 9). Ressalta-se que nos grupo SAL+ECR e SAL+ECV (Figura 9) há redução significativa do limiar de retirada mecânico, bem como do IA, no teste da placa quente, quando comparado com os seus respectivos valores basais (Figuras 9 e 10).

A análise estatística (teste t-Student pareado) dos resultados de sensibilidade mecânica orofacial apontou diferença significativa nos grupos SAL+EA ($p < 0,001$) e SAL+ECR ($p < 0,001$) quando comparados os valores do 15º dia experimental com os respectivos valores basais (Figura 9). Em adição, há também diferença estatística significativa dos valores de retirada mecânica orofacial frente à estímulo inócuos nos grupos CFA ($p < 0,005$), CFA+EA ($p < 0,001$), CFA+ECV ($p < 0,001$) e CFA+ECR ($p < 0,001$, Figura 9).

Considerando os resultados do teste da placa quente, a aplicação da ANOVA de duas vias para medidas repetidas evidenciou diferença do IA considerando o fator tratamento ($F_{7,383} = 9,256$; $p < 0,001$), o fator tempo ($F_{7,383} = 5,550$; $p < 0,001$), bem como observou-se interação tempo e tratamento ($F_{49,383} = 1,827$; $p = 0,002$). Com destaque, o teste *post hoc* de Newman-Keuls apontou diferença ($p < 0,05$) do IA nos grupos SAL (sem estresse) e SAL+EA quando comparados com o IA dos grupos SAL+ECR, SAL+ECV, CFA, CFA+ECR e CFA+ECV (Figura 10). Ainda, o grupo CFA foi diferente ($p < 0,05$) do grupo CFA+EA (Figura 10). Ressalta-se que o IA do grupo CFA diferiu ($p < 0,05$, Newman-Keuls) do seu IA basal, durante todo o período experimental (Figura 10). Nos grupos submetidos ao estresse agudo, o IA foi diferente ($p < 0,05$, Newman-Keuls) do seu respectivo valor basal nos tempos 0 min e 5 min para o grupo SAL+EA e nos tempos 50 min e 60 min para o grupo CFA+EA comparado com o tempo 0 min e 5 min (Figura 10C). Na interação tempo e tratamento a aplicação do teste *post hoc* Newman-Keuls evidenciou diferença ($p < 0,05$) do IA dos grupos SAL, SAL+EA e CFA+EA quando comparados com os grupos (CFA, SAL+ECR, SAL+ECV, CFA+ECV, CFA+ECR) nos períodos 0 min, 5 min, 15 min e 23 min do tempo experimental. Em adição, o IA do grupo CFA foi diferente ($p < 0,05$, Newman-Keuls) do IA do grupo SAL durante todo o período experimental (Figura 10). No tempo de 35 min, o IA dos grupos SAL e SAL+EA foi diferente ($p < 0,05$, Newman-Keuls) do IA dos grupos SAL+ECV, SAL+ECR, CFA+ECV e CFA+ECR. Aos 50 min do teste da placa quente, o IA dos grupos SAL e SAL+EA foi diferente ($p < 0,05$, Newman-Keuls) dos demais grupos, enquanto que aos 60 min do teste apenas o IA do grupo SAL+EA foi diferente dos demais tratamentos (Figura 10).

Figura 9: Média $\pm$ erro padrão da média do limiar de retirada (em gramas), após a aplicação de estímulo mecânico inócuo orofacial, antes (Basal) ou 15 dias após o tratamento intra-articular (ATM bilateral) com (CFA) ou solução salina 0,9% estéril (SAL), e submetidos (EA, ECV, ECR) ou não (Controle) a diferentes protocolos de estresse. * $p < 0,05$ teste t-Student pareado quando comparado o limiar de retirada (g) com o respectivo período basal. EA: estresse agudo; ECV: estresse crônico variado; ECR: estresse crônico repetido. Os números em parênteses representam o número de animais para cada grupo experimental.

Figura 10: Média $\pm$ erro padrão da média do Índice de Antinociceção no teste da placa quente (IA), antes (Basal) ou 15 dias após o tratamento intra-articular (ATM bilateral) com (CFA) ou solução salina 0,9% (SAL), e submetidos a diferentes protocolos de estresse (EA, ECV, ECR) ou não. (a) $p < 0,05$ teste Newman-Keuls quando comparado o IA do período experimental com seu respectivo IA basal. (b) $p < 0,05$ teste Newman-Keuls quando comparado o IA do grupo CFA com grupo SAL. (c) $p < 0,05$ teste de Newman-Keuls quando comparado o IA com IA aos 0 min e 5 min. (*) $p < 0,05$ teste Newman-Keuls quando comparado o IA do grupo CFA+EA com o grupo CFA. (#) $p < 0,05$ teste Newman-Keuls quando comparado o IA dos grupos SAL+ECR, SAL+ECV, CFA+ECR e CFA+ECV com os grupos SAL, SAL+EA e CFA+EA. EA: estresse agudo; ECR: estresse crônico repetido; ECV: estresse crônico variado. $n = 6$ para cada grupo experimental.

Comportamento emocional avaliado no teste do Labirinto em cruz elevado

Os resultados obtidos no teste do labirinto em cruz elevado mostraram que a administração de CFA intra-articular reduziu o número de entradas nos braços abertos (BA, Figura 11A), bem como a porcentagem de tempo nos braços abertos (%TBA, Figura 11C). Em adição, o estresse crônico variado (ECV) também reduziu o número de entradas nos BA e a %TBA no grupo sem inflamação persistente das ATMs (SAL+ECV, Figura 11). Destaca-se que não ocorreu alteração do número de entradas nos braços fechados, de todos os grupos realizados (Figura 11B).

Na análise dos resultados do teste do labirinto em cruz elevado (LCE), a aplicação da ANOVA de uma via evidenciou diferença quanto ao tratamento considerando o número de entradas nos braços abertos (BA, $F_{7,47} = 7,927$, $p < 0,001$) e a porcentagem de tempo nos braços abertos (%TBA, $F_{7,47} = 7,557$, $p < 0,001$). Entretanto, não foi observada diferença significativa no número de entradas nos braços fechados (BF, $F_{7,47} = 1,565$, $p = 0,174$). O teste *post hoc* Newman-Keuls apontou diferença ($p < 0,05$) no número de entradas nos BA quando comparados os grupos CFA, CFA+EA, CFA+ECR e CFA+ECR com os grupos SAL, SAL+ECV e SAL+ECR (Figura 11A). Ainda o número de entradas nos BA dos grupos CFA, CFA+EA, e CFA+ECR foi diferente ($p < 0,05$) quando comparado com o grupo SAL+EA (Figura 11A). Entretanto, não há diferença significativa do número de entradas nos BA entre os grupos SAL, SAL+EA e SAL+ECR (Figura 11A), nem entre os grupos CFA, CFA+EA, CFA+ECR, CFA+ECV (Figura 11A). Considerando a porcentagem de tempo nos braços abertos (%TBA) evidenciou-se diferença significativa ($p < 0,05$, Newman-Keuls) quando comparados os grupos CFA, CFA+EA e CFA+ECV com grupo SAL e SAL+ECR (Figura 11C). Ainda, há diferença do %TBA quando comparados os grupos SAL+EA com CFA+ECV (Figura 11C).

Figura 11: Média $\pm$ erro padrão da média do número de entradas nos braços abertos (BA, A), do número de entradas nos braços fechados (BF, B) e da porcentagem de tempo nos braços abertos (%TBA, C) em ratos tratados com solução salina 0,9% (SAL) ou adjuvante completo de Freund (CFA) intra-articular (ATM bilateral), e submetidos a diferentes protocolos de estresse (EA, ECV, ECR) ou não. (a) $p < 0,05$ teste Newman-Keuls quando comparado ao grupo SAL. (b) $p < 0,05$ teste Newman-Keuls quando comparado com o grupo SAL+EA. (c) $p < 0,05$ teste de Newman Keuls quando comparado com o grupo SAL+ECR. EA: estresse agudo; ECR: estresse crônico repetido; ECV: estresse crônico variado. $n = 6$ para cada grupo experimental.

2. *Protocolo 2: Avaliação do tratamento com antidepressivo tricíclico, imipramina, na resposta nociceptiva aguda e no comportamento emocional em ratos portadores de inflamação persistente nas ATMs induzida por CFA.*

Sensibilidade mecânica orofacial e Sensibilidade nociceptiva

Com relação à sensibilidade mecânica orofacial, o tratamento com imipramina (IMI) por 5 dias aumentou o limiar de retirada em gramas, em ratos submetidos à administração de CFA intra-articular (ATMs), bilateralmente (Figura 12), e limitou a redução do limiar de retirada induzida pela administração sistêmica (i.p.) crônica de SAL (Figura 12). Além disso, ratos portadores de inflamação persistente das ATMs e tratados com IMI não apresentaram alteração do IA no teste da placa quente (Figura 13). Ressalta-se que o tratamento com IMI não alterou o limiar de retirada de cabeça frente a estímulo mecânico inócuo (Figura 12), nem o IA no teste da placa quente em ratos que receberam a administração de solução salina 0,9% (SAL) intra-articular (Figura 13).

A análise estatística (teste t-Student pareado) dos resultados de sensibilidade mecânica orofacial apontou diferença significativa nos grupos SAL+SAL ($p < 0,05$), CFA+SAL ($p < 0,05$) e CFA+IMI ($p < 0,05$) quando comparados os valores do 15º dia experimental com os respectivos valores basais (Figura 12).

Considerando os resultados do teste da placa quente, a aplicação da ANOVA de duas vias para medidas repetidas evidenciou diferença do IA considerando o fator tratamento ($F_{3,159} = 6,095$; $p < 0,005$) e interação tempo e tratamento ($F_{21,159} = 1,818$; $p < 0,05$), porém, não há diferença no fator tempo ($F_{7,159} = 0,758$; $p = 0,629$). Com destaque, o teste *post hoc* de Newman-Keuls apontou diferença ($p < 0,05$) do IA no grupo CFA+IMI quando comparado com os IA dos grupos CFA+SAL e SAL+IMI (Figura 13). Destaca-se que o IA durante todo o período experimental do grupo CFA+SAL diferiu do seu respectivo IA basal, entretanto, não há diferença ao longo do tempo do IA dos demais grupos experimentais comparados com seus respectivos IA basal (Figura 13). Considerando a interação tempo e tratamento a aplicação do teste *post hoc* Newman-Keuls evidenciou diferença ($p < 0,05$) do IA do grupo CFA+IMI quando comparado com o IA do grupo CFA+IMI durante todo o período experimental (Figura 13). Ainda, o IA do grupo CFA+IMI diferiu do IA do grupo SAL+IMI nos tempos 0 min, 5 min e 60 min. Entretanto, não se observou diferença do IA ao longo do tempo quando comparados os grupos SAL+SAL e SAL+IMI (Figura 13).

Figura 12: Média $\pm$ erro padrão da média do limiar de retirada (em gramas), após a aplicação de estímulo mecânico inócuo orofacial), no antes (Basal) ou 15 dias após a administração intra-articular (ATM bilateral) com (CFA) ou solução salina 0,9% (SAL), e submetidos ao tratamento sistêmico crônico (5 dias, 2 vezes ao dia) com imipramina (IMI, 15 mg/kg, via i.p.) ou solução salina 0,9% (1mL/kg, via i.p.). * $p < 0,05$ teste t-Student pareado quando o limiar de retirada (g) do respectivo período basal. Os números em parênteses representam o número de animais para cada grupo experimental.

Figura 13: Média $\pm$ erro padrão da média do Índice de Antinocicepção no teste da placa quente (IA), antes (Basal) ou 15 dias após a administração intra-articular (ATM bilateral) com (CFA) ou solução salina 0,9% (SAL), e submetidos ao tratamento sistêmico crônico (5 dias, 2 vezes ao dia) com imipramina (IMI, 15 mg/kg, via i.p.) ou solução salina 0,9% (1mL/kg, via i.p.). (a) $p < 0,05$ teste Newman-Keuls quando comparado o IA do período experimental com seu respectivo IA basal. (b) $p < 0,05$ teste Newman-Keuls quando comparado o IA do grupo CFA+SAL com o IA grupo CFA+IMI em cada tempo experimental. (*) $p < 0,05$ teste Newman-Keuls quando comparado o IA do grupo CFA+IMI com o IA do grupo SAL+IMI. SAL+SAL n = 5; SAL+IMI n = 6; CFA+SAL n = 6; CFA+IMI n = 7.

Comportamento emocional avaliado no teste do Labirinto em cruz elevado

Os resultados do teste do labirinto em cruz elevado (LCE) mostraram que o tratamento sistêmico com o antidepressivo tricíclico, imipramina (CFA+IMI), bloqueou a redução do número de entradas nos braços abertos (Figura 14A) induzida pela administração de CFA intra-articular (ATMs bilateralmente). Entretanto não foi observada alteração da atividade locomotora avaliada pelo número de entradas nos braços fechados (Figura 14B) e na porcentagem de tempo nos braços abertos (%TBA, Figura 14C).

Na análise dos resultados do teste do labirinto em cruz elevado (LCE), a aplicação da ANOVA de uma via evidenciou diferença quanto ao tratamento considerando o número de entradas nos braços abertos (BA, $F_{3,23} = 3,379$, $p < 0,05$, Figura 14A). Entretanto, não foi observada diferença significativa na porcentagem de tempo nos braços abertos (%TBA, $F_{3,23} = 1,177$, $p = 0,343$) e no número de entradas nos braços fechados (BF, $F_{3,23} = 2,565$, $p = 0,083$).

Figura 14: Média $\pm$ erro padrão da média do número de entradas nos braços abertos (BA, A), do número de entradas nos braços fechados (BF, B) e da porcentagem de tempo nos braços abertos (%TBA, C) em ratos tratados com solução salina 0,9% (SAL) ou adjuvante completo de Freund (CFA) intra-articular (ATM bilateral), e submetidos ao tratamento sistêmico crônico (5 dias, 2 vezes ao dia) com imipramina (IMI, 15 mg/kg, via i.p.) ou solução salina 0,9% (1mL/kg, via i.p.) SAL+ECR. EA: estresse agudo; ECR: estresse crônico repetido; ECV: estresse crônico variado. SAL+SAL n = 5; SAL+IMI n = 6; CFA+SAL n = 6; CFA+IMI n = 7.

3. *Protocolo 3: Efeito da administração de agonista e antagonista para receptores CRF no núcleo central da amígdala na sensibilidade nociceptiva em ratos portadores de inflamação persistente das ATMs.*

Os resultados deste conjunto de experimentos mostraram que a administração de CRF intra-CEA promoveu aumento do IAPQ, nos ratos sem inflamação persistente das ATMs (Figura 14A). Em adição o tratamento com CRF intra-CEA impediu a redução do IAPQ induzida pela administração de CFA intra-articular (Figura 14B). Além disso, o tratamento com α -hCRF intra-CEA não alterou o IAPQ *per se* (grupo SAL+ α -hCRF), bem como não alterou a redução do IAPQ induzida pelo CFA (grupo CFA+ α -hCRF, Figura 15).

A aplicação da ANOVA de duas vias para medidas repetidas evidenciou diferença no fator tratamento ($F_{25,287} = 33,024$, $p < 0,001$), e interação tempo tratamento ($F_{35,287} = 12,469$, $p < 0,001$). Porém, não apontou diferença significativa no fator tempo ($F_{7,287} = 2,098$, $p = 0,070$). O teste *post hoc* de Newman-Keuls ($p < 0,05$) mostrou que o IA dos grupos CFA+SAL CFA+ α -h-CRF foi diferente do IA do seu respectivo IA basal, bem como do IA do grupo SAL+SAL, SAL+CRF e SAL+CRF ao longo do tempo experimental (Figura 15B). Em adição, o IA do grupo SAL+CRF foi diferente (teste Newman-Keuls $p < 0,05$) do seu respectivo IA basal, bem como do IA dos grupos SAL+SAL e SAL+ α -h-CRF, até 50 min do tempo experimental (Figura 15A).

A Figura 16 apresenta os sítios de microinjeção localizados no CEA dos distintos grupos experimentais deste protocolo, e a Figura 17 mostra uma fotomicrografia de um sítio de microinjeção de um animal experimental, localizado no CEA.

Figura 15: Índice de Antinocicepção do teste de placa quente (IAPQ) de ratos que receberam injeção bilateral na região das ATMs de 50 μ L de solução salina 0,9 % ou CFA (50 μ L CFA em suspensão (óleo/salina 1:1) e 15 dias após receberam microinjeção de salina (0,9%, 0,2 μ L), de agonista do receptor CRF na dose 1,0 μ g/0,2 μ L ou do antagonista do receptor CRF (α -hCRF) na dose 1,0 μ g/0,2 μ L no núcleo central da amígdala. (a) $p < 0,05$ teste de Newman Keuls quando comparado com o seu respectivo IA basal. (b) $p < 0,05$ teste de Newman Keuls quando comparado com o IA dos grupos SAL+SAL, SAL+ α -hCRF. (c) $p < 0,05$ teste de Newman Keuls quando comparado com o grupo CFA+CRF. * $p < 0,05$ teste de Newman Keuls quando comparado o grupo CFA+SAL, CFA+ α -hCRF com o grupo SAL+SAL. SAL+SAL $n = 7$; SAL+CRF $n = 7$; SAL+ α -hCRF $n = 6$; CFA+SAL $n = 7$; CFA+CRF $n = 7$; CFA+ α -hCRF $n = 7$.

Figura 16: Representação esquemática de secções frontais obtidas em planos representativos da amígdala de ratos: (●) salina esterilizada 0,9%, 0,2 μ L; (□) 1,0 μ g/0,2 μ L agonista CRF; (▲) 1,0 μ g/0,2 μ L antagonista CRF (α -h-CRF₉₋₄₁). Abreviações: CEA: núcleo central da amígdala; TO: trato óptico. Todas as microinjeções foram realizadas do lado esquerdo, a representação do lado direito é para melhor visualização. O número de pontos pode ser menor do que o número de animais em cada grupo devido à sobreposição de sítios de microinjeção.

Figura 17: Fotomicrografia de um corte transversal do encéfalo de rato com cânula-guia dirigida para o núcleo central da amígdala após coloração pela técnica de Nissl (cresil violeta). Abreviação: TO: Trato Ótico, CEA: Núcleo Central da Amígdala. Aumento de 2,5X. A barra representa 100 μ m.

V. DISCUSSÃO

1. *Avaliação da resposta nociceptiva e do efeito de diferentes situações de estresse sobre essa resposta em ratos portadores de inflamação persistente nas ATMs.*

Os resultados do presente trabalho mostraram que a inflamação persistente das ATMs promoveu alodinia mecânica orofacial e hiperalgesia secundária, observados pela redução do limiar mecânico orofacial (Figura 9), bem como pela redução do IAPQ (Figura 10). Ainda, o EA *per se* promoveu analgesia avaliada pelo teste de sensibilidade mecânica orofacial (Figura 9), bem como no teste da placa quente (Figura 10). Além disso, o EA reduziu a alodinia mecânica e a hiperalgesia secundária induzidos pelo CFA intra-articular. Considerando os protocolos de estresse crônico, os resultados mostraram que o ECV e o ECR promoveram *per se* hiperalgesia evidenciada no teste de sensibilidade mecânica orofacial (Figura 9), bem como no teste da placa quente (Figura 10 B e D). Ainda, o ECV e o ECR não alteraram o efeito da administração intra-articular de CFA.

Os resultados do presente trabalho corroboram dados anteriores demonstrando que CFA atua como agente irritante, induzindo inflamação e hiperalgesia em modelos experimentais, inicialmente, sendo utilizado nos membros posteriores de ratos. (STEIN e cols., 1988; HYLDEN e cols., 1989). Posteriormente, esse método foi adaptado para produzir inflamação persistente e hiperalgesia na região orofacial (REN e DUBNER, 1996, IMBE e REN, 1999). Estudo recente (Nascimento e cols., 2013) mostraram que a administração bilateral de CFA nas ATMs promoveu alodinia mecânica orofacial, bem como hiperalgesia orofacial. O presente trabalho acrescenta a hiperalgesia secundária que acompanha a inflamação intra-articular, a qual foi observada pela redução do IAPQ em ratos.

A nocicepção originada de tecidos e regiões como da ATM tem como característica a hiperalgesia persistente e resulta em acentuada hiperexcitabilidade de neurônios do corno dorsal da medula espinhal (IWATA e cols., 1999). De fato, estudos prévios demonstraram que a injeção de CFA nas ATMs de ratos produz profunda resposta inflamatória que pode perdurar por até 6 semanas (HARPER e cols., 2001). Os autores mostraram por meio da análise histológica das articulações temporomandibulares, onde se realizou administração de CFA, intenso infiltrado inflamatório agudo, com a presença de neutrófilos e macrófagos, no tecido intracapsular das ATMs. No presente trabalho, a inflamação das ATMs em ratos foi demonstrada com o aumento do extravasamento plasmático na região das ATMs em ratos portadores de inflamação persistente pelo período de 15 dias (Figura 7).

De fato, desordens na articulação temporomandibular (DTMs) frequentemente envolvem o componente inflamatório (GOULET e cols., 1995). Desta forma, estudos relataram que inflamação na ATM promoveu a produção de substâncias pró-inflamatórias, incluindo taquicinas, como a

substância P, e peptídeos como o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) (CARLESSON e cols., 1997). Além desses mediadores, pacientes com DTM apresentaram altos níveis de interleucina-1 β (IL-1 β) no fluido sinovial (HARPER e cols., 2000).

A hiperalgesia resultante da administração de agentes inflamatórios está associada a alterações na transmissão e modulação do estímulo nociceptivo na medula espinhal (DUBNER e RUDA, 1992). Evidências sugerem que há desenvolvimento de hiperexcitabilidade espinhal acompanhada de dor persistente, envolvendo a ativação de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA (Guo e cols., 2002; Ro, 2003). Em particular, trabalho de Guo e cols. (2002) demonstrou aumento dos receptores NMDA no corno dorsal da medula espinhal, correlacionando este receptor com o desenvolvimento da inflamação e hiperalgesia induzidas por injeção intraplantar de CFA. Em adição, Ro (2003) mostrou a participação de receptores NMDA na nocicepção orofacial e na formação de edema decorrente da inflamação aguda promovida pela administração no músculo masseter de óleo de mostarda. Além disso, foi demonstrado que a injeção de CFA na ATM aumentou a atividade de neurônios nociceptivos trigeminais, bem como promoveu a expansão dos campos receptivos destas células (IWATA e cols., 1999).

É importante destacar que a inflamação que ocorre localmente após a aplicação de CFA no músculo masseter pode promover hiperalgesia mecânica secundária que se difunde além da região orofacial para as patas traseiras de ratos (AMBALAVANAR e cols., 2006). Outros estudos demonstraram que a dor, a hiperalgesia e a alodinia podem se propagar para regiões distantes do local de origem da inflamação, em diversas condições crônicas (SCOTT e cols., 2005). Nossos achados corroboram estes resultados, desde que a injeção de CFA bilateralmente na região das ATMs promoveu alteração da sensibilidade nociceptiva térmica no teste da placa quente. De forma semelhante, Okamoto e cols. (2006) mostraram que a inflamação provocada pela administração de CFA (0,025 mg, 0,05 ml) na região da ATM esquerda de ratos aumentou as respostas comportamentais nociceptivas evocadas pela injeção de formalina na pata traseira, 10 a 14 dias após a indução da inflamação intra-articular. Ainda, essa inflamação aumentou a expressão da proteína FOS no corno dorsal da medula espinal, nas laminae I-II e V-VI, ipsilateral a injeção de formalina. Esses resultados sugeriram que a inflamação persistente das ATMs induz alterações neurais centrais em estruturas espinhais e supra espinhais, as quais podem induzir e manter a ocorrência de hiperalgesia em outras regiões corporais.

Considerando estudos clínicos, pacientes portadores de DTM comumente relatam sintomatologia dolorosa em áreas corporais distantes da região orofacial (FILLINGIM e cols., 1998, JOHN e cols., 2003), além de exibirem pronunciada somação temporal da dor a estímulos térmicos nociceptivos repetidos aplicados na região da face e também nas mãos (MAIXNER e cols., 1998; TURP e cols., 1998). É possível que esses pacientes apresentem reduzida habilidade da ativação de

sistemas endógenos de controle da dor ou desequilíbrio em sua modulação (BRAGDON e cols., 2002; SARLANI e cols., 2004).

Uma das possíveis explicações para o aumento de sensibilidade nociceptiva em regiões corporais distantes da área orofacial pode ser a ativação de vias propioespinhais entre o núcleo espinhal do trigêmeo e a medula espinhal lombar (MILLER e cols., 1998). De fato, a injeção de CFA na região das ATMs promove sensibilização de neurônios do subnúcleo caudal do núcleo espinhal do trigêmeo e da região cervical da medula espinhal (região Vc/C2) (ZHOU e cols., 1999; IMBE e cols., 2001). A região Vc/C2 pode modular a atividade neuronal do corno dorsal da medula espinhal lombar via projeções propioespinhais. Estudo anatômico evidenciou que neurônios da região cervical da medula espinhal possuem projeções propioespinhais descendentes para a região lombo-sacral (MILLER e cols., 1998). Desta forma, é possível, em nossos resultados que a sensibilização das projeções propioespinhais, devido à inflamação persistente da ATM, promoveu a hiperalgesia observada no teste da placa quente em ratos.

Em adição, nossos resultados demonstraram alterações comportamentais nos ratos submetidos à inflamação das ATMs e avaliados no teste do LCE. Com destaque, observou-se diminuição do número de entradas nos BA e diminuição da %TBA, sem alterar a atividade exploratória avaliada pelo número de entradas nos BF (Figura 11). Estes dados corroboram estudo recente (NASCIMENTO e LEITE-PANISSI, 2014) evidenciando efeito ansiogênico em ratos portadores de inflamação persistente das ATMs. Ressalta-se que no presente estudo, foi realizada análise do comportamento emocional após 15 dias da indução da inflamação persistente nas ATMs, enquanto que no estudo anterior (NASCIMENTO e LEITE-PANISSI, 2014), o efeito ansiogênico foi analisado no 10º dia de inflamação. Desta forma, este estudo mostra que o efeito ansiogênico induzido pela inflamação persistente da ATMs é mantido, acompanhando a manutenção da resposta inflamatória intra-articular.

Com destaque, algumas evidências sugerem estreita relação entre a intensidade da sensibilidade à dor e o estado emocional individual (MASON e GAO, 1980; BROWN, 1999; KRISHNAN e cols., 1985). Assim, é possível que a magnitude da inibição tônica da transmissão da dor na medula espinhal, realizada pelas vias descendentes modulatórias, seja dependente do estado emocional do organismo, ou seja, da depressão, do medo, e da ansiedade (MASON e GAO, 1980). De forma particular, a dor crônica está associada com as alterações emocionais de ansiedade e depressão (PARENT e cols., 2012). Ainda, estudos realizados com pacientes com dor crônica mostraram redução do N-acetil aspartato na região do córtex orbitofrontal, e no córtex pré-frontal dorsolateral (GRACHEV e cols., 2000). Devido ao envolvimento dessa primeira estrutura com comportamento de ansiedade (GRACHEV e APKARIAN, 2000) é possível sugerir interação entre essa resposta emocional e a experiência de dor crônica. De fato, estudos sobre ansiedade e

depressão evidenciaram maior prevalência de sintomas destes transtornos psicológicos em populações com dor crônica ou persistente, quando comparados com indivíduos saudáveis (KRISHNAN e cols., 1985, BROWN, 1990). De fato, é interessante reportar que pacientes com DTM apresentam maior grau de estresse, depressão e ansiedade quando comparados com os grupos controle saudáveis (JONES e cols., 1997). Desta forma, nossos dados corroboram estudos que sugerem a correlação entre a inflamação persistente, em particular das ATMs, e a alteração do estado emocional do indivíduo.

Em situações clínicas e experimentais, a ansiedade e a experiência dolorosa muitas vezes são positivamente relacionadas. Dentro desta perspectiva, estudo prévio observou que o estado de ansiedade pode aumentar a dor por meio da liberação de catecolaminas, pela sensibilização periférica ou pela estimulação direta de nociceptores (CHAPMAN e TURNER, 1986). Por outro lado, Bolles e Fanselow (1980) postularam que o medo e a ansiedade são capazes de inibir a sensibilidade dolorosa devido a liberação de opióides endógenos. Desta forma, fica evidente a necessidade de que estudos detalhados para elucidar os mecanismos pelos quais ocorre a correlação entre modulação da sensibilidade dolorosa e o comportamento emocional.

As principais vias nociceptivas são mediadas por projeções espinotalâmicas corticais. Assim, vias ascendentes nociceptivas com origem na medula espinhal foram demonstradas em roedores (RAINVILLE, 2002). Uma dessas vias é a projeção da medula espinhal para o núcleo parabraquial (Pb), hipotálamo e amígdala. Parte da informação nociceptiva das ATMs pode ser transmitida por meio da vias espino(trigêmio)pontoamigdalóide (BERNARD e cols., 1989), espino(trigêmio)parabraquiohipotalâmica (BESTER e cols., 1995) e espinohipotalâmica (GIESLER, 1995). Essas vias que se iniciam, principalmente, nas lâminas I e V do corno dorsal da medula espinhal, ou então, no núcleo espinhal do trigêmeo alcançam, principalmente, a parte lateral da área parabraquial. Por sua vez, a área parabraquial retransmite essas informações nociceptivas para a amígdala e para o hipotálamo. De fato, trabalho de Hermanson e Blomqvist (1997) em que se avalia a expressão de FOS em estruturas encefálicas após aplicação de um estímulo nocivo orofacial (injeção de paraformaldeído 1,85% na região do lábio superior de ratos) mostrou que a região lateral externa da parabraquial (Pbel) recebe grande parte da informação nociceptiva do núcleo espinhal do trigêmeo. Por sua vez a Pbel é a origem principal de eferências para o núcleo central da amígdala (BERNARD e cols., 1989; BERNARD e cols., 1993; MA e PESCHANSKI, 1988). Em adição, estudos anatômicos demonstraram que apesar dos neurônios do núcleo parabraquial pontino realizarem sinapse, principalmente, no núcleo central da amígdala, esses axônios possuem colaterais que se dirigem para o tálamo e hipotálamo. A informação nociceptiva é transmitida por meio dessa via, denominada espino(trigêmeo)parabraquiohipotalâmica (BESTER e cols., 1995). Assim, da mesma forma que a via espino(trigêmeo)pontoamigdalóide, esta via com participação hipotalâmica

está intimamente envolvida em reações afetivas-motivacionais, comportamentais e autonômicas ao estímulo nocivo (BERNARD e cols., 1993; BESTER e cols., 1995).

Considerando estados emocionais modulando respostas nociceptivas, os resultados do presente trabalho mostraram que o EA reduziu a sensibilidade mecânica orofacial, bem como a sensibilidade nociceptiva avaliada no teste da placa quente (Figura 10C), sugerindo efeito antinociceptivo. Em contraste, o ECR e o ECV promoveram redução do limiar de retirada mecânica, bem como do IAPQ, evidenciando efeito hipernocicepção (Figura 10 B e D). Ainda, o EA impediu a alodinia mecânica em ratos portadores de inflamação persistente das ATMs, bem como a hiperalgesia avaliada no teste da placa quente. Entretanto, o ECV e o ECR não alteraram a alodinia mecânica orofacial, nem a hiperalgesia secundária desencadeada pela administração intra-articular (ATMs) de CFA (Figura 9). Juntos, os resultados deste trabalho demonstraram a íntima relação entre a modulação nociceptiva e respostas emocionais, onde os dois sistemas, nociceptivo e emocional interagem diretamente. Em resumo, o estresse agudo apresentou efeito antinociceptivo, enquanto que o estresse crônico, repetido ou variado apresentaram efeito hiperalgésico.

De acordo com a literatura, o estresse pode promover aumento ou inibição da sensibilidade dolorosa, dependendo do estímulo, da duração e da intensidade do estímulo (JAYARAM e cols., 1995). Dentro desta perspectiva, a exposição aguda a diferentes estímulos estressores podem promover analgesia em testes nociceptivos (TURP e cols., 1998, VACCARINO e KASTIN, 2001). De fato, estudos demonstraram que o estresse agudo por contenção é capaz de promover aumento da latência no teste de retirada de cauda em ratos machos e fêmeas, quando comparados com animais não estressados (GAMARO e cols., 1998; da SILVA TORRES, 2003).

A redução da sensibilidade à dor destaca-se como um dos mais importantes elementos da resposta do organismo em relação a situações de emergência (BRANDÃO, 2004). Frente a uma realidade de estresse, as respostas de defesa (reflexo de retirada, fuga, repouso e outros comportamentos recuperativos) podem ser suprimidas em favor de comportamentos mais adaptativos. Ainda, considerando que as respostas naturais do organismo às situações de emergência incluem também redução da sensibilidade à dor, supõe-se que o sistema analgésico que utiliza opióides endógenos possa participar na mediação do comportamento defensivo (MICZEK e cols., 1986). Vários estudos têm demonstrado que diferentes situações de estresse podem promover antinocicepção tanto de origem opióide, como não opióide (LEWIS e cols., 1980), envolvendo a neurotransmissão histaminérgica, colinérgica e serotoninérgica (TRICKLEBANK e CURZON, 1984). De fato, o pré-tratamento com naloxone, antagonista de receptores opióides, bloqueia a antinocicepção induzida por diferentes tipos de estresse, tais como exposição à água fria (BODNAR e cols., 1979), choques elétricos (CHESHER e CHAN, 1977), bem como a antinocicepção que acompanha a emissão de comportamentos de defesa (LEITE-PANISSI e cols., 2001). Com relação

ao estresse de restrição, foi demonstrado que a administração intracerebroventricular de antagonista angiotensinérgicos (saralasin) ou de naloxone preveniu a antinocicepção avaliada pelo teste de retirada de cauda em ratos (HAULICĂ e cols., 1986).

Em contrapartida, estudos demonstraram que o estresse crônico de restrição é capaz de induzir hiperalgesia de longa duração no teste de retirada de cauda (GAMARO e cols., 1998). Considerando a nocicepção orofacial, Gameiro e cols. (2006b), demonstraram que o estresse crônico promoveu aumento de comportamentos nociceptivo em teste de formalina intra-ATM. Nossos resultados corroboram estes achados, desde que demonstraram que o estresse crônico, repetido ou variado, promoveu hiperalgesia no teste de placa quente nos animais sem inflamação persistente nas ATMs, porém a hiperalgesia produzida pela administração de CFA intra-articular não foi potencializada pelo estresse. É possível que considerando que o CFA promove inflamação intensa, a hiperalgesia tenha atingido seu limite, não sendo possível o ECV ou ECR promover somação neste efeito.

Estudo prévio (Gameiro e cols., 2006b) realizado para avaliar a ansiedade em animais submetidos a estresse de restrição agudo (15, 30 e 60 minutos) e crônico (restrição de 1 hora por dia, 5 dias por semana durante 40 dias) verificou que os diferentes protocolos de estresse promoveram alterações no comportamento emocional em ratos submetidos ao teste do LCE, induzindo níveis significativos de ansiedade, avaliados por meio da diminuição número de entradas nos braços abertos e da porcentagem de tempo despendida nesses braços. De fato, nossos resultados demonstram que o estresse agudo apesar de ter se mostrado capaz de promover alteração da sensibilidade mecânica e térmica não foi capaz de alterar o comportamento dos animais submetidos ao LCE, enquanto que os animais que receberam administração intra-articular de CFA e foram avaliados no LCE continuaram apresentando comportamento ansiogênico. Em nosso modelo podemos atribuir a não ocorrência de alteração comportamental no LCE entre os animais submetidos ou não a estresse agudo de restrição ao longo tempo esperado (24 horas) entre a sessão de estresse e a avaliação desses animais no LCE. De forma semelhante, a exposição dos animais a estresse de restrição repetido não promoveu alteração do comportamento ansiogênico no LCE. Estudo de Gameiro e cols. (2006b), verificou que não houve diferença nos níveis de hormônio liberador da adrenocorticotropina (ACTH) plasmático de animais submetidos a estresse crônico de restrição por 3 e 40 dias quando comparados com seus respectivos controles. Esses achados corroboram as afirmações de que pode ocorrer um processo adaptativo ao estímulo estressante (GAMARO e cols., 1998). Dessa forma podemos atribuir nossos achados do protocolo de estresse de restrição crônico a essa adaptação ao estímulo repetido.

Em contrapartida, quando submetemos os animais a estresse crônico variado, sendo os agentes estressores imprevisíveis em sua forma e duração, verificamos a ocorrência de efeito

ansio gênico nos animais submetidos a esse tipo de estresse quando comparados ao grupo que recebeu administração de solução salina intra-articular e não foi submetido a estresse. Dessa forma podemos afirmar que as alterações causadas por agentes estressores que não podem ser previstos causam alterações persistentes no comportamento emocional desses animais. De forma oposta, não verificamos alterações comportamentais entre os animais que receberam administração intra-articular de CFA submetidos ou não a estresse crônico variado. Isso pode ser devido ao fato da sintomatologia dolorosa provocada pelo CFA ser por si só estímulo estressante suficiente para alterar o comportamento dos animais no LCE.

Em nosso estudo, foi avaliado a ação da inipramina, um antidepressivo tricíclico, inibidor da recaptação de serotonina e noradrenalina, sobre a sensibilidade dolorosa de ratos com inflamação persistente das ATMs e ratos controles. Neste protocolo foi verificado que esse fármaco reverteu a hiperalgesia causada pela administração de CFA intra-articular, verificada pelo teste de placa quente, exercendo dessa forma efeito analgésico. Embora existam estudos que indicam a eficácia desse fármaco em dor aguda experimental (BROOM e cols., 1986), os antidepressivos têm sido utilizados há mais de 30 anos (MAGNI, 1991) para tratamento de alguns tipos de dor, incluindo a dor orofacial crônica (McNEILL, 1993). De fato, já foi demonstrado que a inipramina possui efeito analgésico no teste de formalina (ZARRINDAST e cols., 2003), no teste da placa quente (SAHEBGHARAI e ZARRINDAST, 2001) e em situações de dor neuropática (ZARRINDAST e cols., 2000).

Neurônios das vias ascendentes de transmissão nociceptiva podem ser modulados por fibras descendentes serotoninérgicas e noradrenérgicas (WEI e cols., 1999 a e b). Gameiro e cols. (2006b) propuseram que alterações na atividade central do sistema serotoninérgico podem explicar as modificações bidirecionais na nocicepção (analgesia e hiperalgesia) verificadas após diferentes situações de estresse. Ainda, os autores sugerem que estresse e ansiedade são capazes de alterar a transmissão serotoninérgica central. Após exposição aguda a diferentes tipos de estímulos aversivos, fisiológicos ou psicológicos, ocorre aumento da concentração extracelular de serotonina em diversas estruturas encefálicas, especialmente no núcleo magno da rafe (ADELL e cols., 1997). De forma oposta, o estresse prolongado diminui o efluxo de serotonina em estruturas do sistema nervoso central que são ativadas pelo estresse, como amígdala e septo lateral (KIRBY e cols., 1995), produzindo sensibilização das vias centrais da dor. Esse estudo demonstrou que a administração de fluoxetina, inibidor seletivo da recaptação de serotonina, 30 minutos antes da injeção de formalina intra-articular promoveu efeito analgésico análogo ao efeito produzido pela morfina (GAMEIRO e cols., 2004). Em adição, Mochizucki (2004) mostrou a eficácia dos inibidores da receptação de serotonina e noradrenalina, em modelo animal de dor crônica, utilizando como estímulo nocivo a injeção de formalina na pata de ratos. Este estudo evidenciou

que os inibidores da recaptação de serotonina e noradrenalina, como a imipramina, são mais eficientes no controle da dor que os inibidores seletivos da recaptação da serotonina.

Nossos experimentos demonstraram ainda que a administração i.p. de imipramina foi capaz de reverter o efeito ansiogênico causado pelo CFA intra-articular, uma vez que os animais que receberam injeção de CFA nas ATMs e tratados com imipramina apresentaram aumento do percentual de entradas nos braços abertos. Na literatura encontram-se poucos estudos que investigam a relação entre o efeito analgésico de antidepressivos e as alterações emocionais em situações de dor crônica. Dentro desse contexto, novas evidências mostram que a administração repetida de antidepressivos inibidores da recaptação de serotonina são capazes de prevenir significativamente a hiperalgesia térmica e reverter comportamentos ansiogênicos após lesão do nervo ciático em ratos (MATSUZAWA-YANAGIDA e cols.; 2008). O possível mecanismo do efeito ansiolítico dos antidepressivos pode ser pela ação anti-hiperalgésica e anti-alodinia, e desta forma, previne o aparecimento de comportamentos de ansiedade induzidos pela dor crônica (MATSUZAWA-YANAGIDA e cols.; 2008).

2. Avaliação do efeito da administração de agonista e antagonista para receptores CRF no núcleo central da amígdala na sensibilidade nociceptiva em ratos portadores de inflamação persistente das ATMs.

Na segunda etapa deste trabalho, avaliamos o envolvimento de receptores para CRF do CEA na sensibilidade nociceptiva secundária em ratos com inflamação persistente das ATMs. Nossos resultados demonstraram que a ativação desses receptores foi capaz de promover aumento do IAPQ nos animais que receberam administração de salina nas ATMs e ainda foi capaz de reverter a hiperalgesia causada pela administração intra-articular do CFA (Figura 15). De fato, existem na literatura evidências demonstrando que o CRF produz analgesia após administração por via local, sistêmica e central, destacando a capacidade do CRF de modular a dor em diferentes níveis do neuroeixo (LARIVIERI e MELZACK, 2000).

Em situações de dor associada à inflamação periférica a administração local de CRF produziu efeito antinociceptivo por meio da liberação de opióides pelas células associadas à resposta imunológica, resultando na inibição das fibras aferentes periféricas (HARGREAVES e cols., 1990). Em contrapartida, estudo de Poree e cols. (1989) demonstrou que após a administração intravenosa de CRF, os efeitos antinociceptivos promovidos à estímulos térmicos nocivos não foram revertidos em animais que tiveram as glândulas hipófise e adrenal previamente removidas, sugerindo que a ação do CRF na modulação da dor independe da liberação de beta-endorfina, cortisol ou do ACTH. Porém achados de Hargreaves e cols. (1990) mostraram que a ação antinociceptiva periférica em ratos foi bloqueada em animais hipofisectomizados, sugerindo que a ação do CRF é dependente da liberação de beta-endorfina da hipófise. Desta forma, o efeito antinociceptivo de CRF envolvendo o sistema opióide ainda necessita de mais estudos para ser esclarecido.

Com relação à ação central do CRF, estudos mostraram que a liberação deste peptídeo modula a atividade tônica de neurônios localizados em estruturas que compõem as vias de modulação nociceptiva, tais como o locus coeruleus (VALENTINO e FOOTE, 1987), hipocampo (ALDENHOFF e cols., 1983) e amígdala (JI e NEUGEBAUER, 2008). Nos últimos anos, estudos eletrofisiológicos (JI e NEUGEBAUER, 2008), bioquímicos (SINNIGER e cols., 2004; ULRICH-LAI e cols., 2006) e comportamentais (LARIVIERI e MELZACK, 2000) apontam a amígdala como um local de modulação da dor mediada pela ação do CRF. A amígdala, particularmente o CEA, é o maior sítio extra-hipotalâmico de expressão do CRF e é um elemento chave dos circuitos extra-hipotalâmicos através dos quais o CRF contribui para comportamentos de ansiedade e alterações comportamentais (ASAN e cols., 2005; REUL e HOLSBOER, 2002). Nos últimos anos, a amígdala emergiu como uma interface neuronal entre dor e distúrbios comportamentais, tais como ansiedade

(FIELDS, 2004; NEUGEBAUER, 2006). De fato, o CEA integra informações relacionadas ao componente afetivo da amígdala lateral e basolateral com aferências nociceptivas subcorticais da via espino-parabraquio-amigdalóide (GAURIAU e BERNARD, 2002). A presença de neurônios contendo CRF na área parabraquial (MERCHENTHALER e cols., 1982) conecta o sistema de CRF na amígdala à via espino-parabraquio-amigdalóide e sugere a participação do CRF na transmissão da informação nociceptiva para a amígdala (JI e NEUGEBAUER, 2007).

A literatura a respeito das funções do CRF relacionadas à dor no sistema nervoso central, incluindo a amígdala, ainda é controversa. Estudo de Williams e cols. (1986) demonstrou efeito hiperalgésico após a administração intracerebroventricular (icv) de CRF em coelhos. Em contrapartida, estudo de Vit e cols. (2006) demonstrou efeito antinociceptivo após administração icv de CRF no limiar de retirada da pata posterior de ratos submetidos ao teste de formalina frente a estímulo mecânico gradual. A razão para esses efeitos heterogêneos ainda não é completamente entendida, mas se discute que o intervalo de doses efetivo para a analgesia induzida pelo CRF é estreito, assim doses menores de CRF icv provocaria aumento da atividade comportamental nociceptiva, enquanto doses mais altas teriam efeito inibitório (LARIVIERI e MELZACK, 2000). Esses achados são consistentes, considerando as diferentes funções dos receptores CRF₁ e CRF₂. De fato, grande número de estudos sugeriram que os receptores CRF₁ medeiam efeitos pró-nociceptivos do CRF, enquanto os receptores CRF₂ possuem função antinociceptiva (TACHE e cols., 2004; TACHE e BONAZ, 2007). Além do mais, o agonista não específico do CRF pode ativar ambos os tipos de receptores, porém possui cerca de 10 a 40 vezes maior afinidade para receptores CRF₁ do que com o CRF₂ (TACHE e cols., 2004). Corroborando essas afirmações, estudo de Ji e Neugebauer (2008) utilizando baixas concentrações de CRF (0,01 a 1 µM) no CEA, as quais levam a ativação de receptores CRF₁, verificou efeitos facilitatórios na dor, enquanto que altas concentrações de CRF (10 µM) causam ativação de receptores CRF₂ levando aos efeitos inibitórios na dor. Da mesma forma, estudo prévio de nosso laboratório em que se verificou o efeito da administração de CRF no CEA e no núcleo basolateral da amígdala (BLA) demonstrou que na dose de 1,0 µg/0,2 µL ocorreu aumento do IAPQ (DONATTI e LEITE-PANISSI, 2013)

No presente trabalho a administração de 1,0 µg/0,2 µL de agonista CRF no CEA promoveu aumento do IAPQ, entretanto, não podemos afirmar se por ativação de receptores CRF₁ ou CRF₂, desde que o CRF tem atuação em ambos receptores.. Os mecanismos facilitatórios e inibitórios ainda necessitam de maiores investigações para serem completamente entendidos, mas acredita-se que o efeito da ativação de receptores CRF será determinado pela relativa dominância entre esses mecanismos opostos. Estudo de Ji e Neugebauer (2008) demonstrou que administração de alta concentração de CRF (10 µM) no CEA produziu inibição da resposta eletrofisiológica de neurônios dessa região após a estimulação nociva da articulação do joelho de ratos. Essa inibição foi mediada

por receptores CRF₂ sugerindo que a ativação do processo inibitório através desses receptores possa se sobrepor aos efeitos facilitatórios da ativação de receptores CRF₁, visto que nessas concentrações os receptores CRF₁ devem estar ocupados pelo CRF (JI e NEUGEBAUER, 2008). Corroborando os resultados obtidos em nosso trabalho, Cui e cols. (2004) demonstraram que a administração de CRF no CEA promoveu antinocicepção térmica e mecânica em ratos. Ainda a administração de antagonista não seletivo para receptores CRF (α -h-CRF₉₋₄₁) no CEA atenuou os efeitos observados pelo tratamento com CRF. Da mesma forma, Donatti e Leite-Panissi (2013) demonstraram que a antinocicepção induzida pela administração de 1,0 μ g/0,2 μ L do agonista para CRF foi bloqueada pelo pré-tratamento com o antagonista, mas a administração isolada do antagonista não alterou o IAPQ, sugerindo que os receptores para CRF nesses núcleos estão envolvidos no mecanismo de regulação nociceptiva, porém não participam de maneira tônica desta circuitaria. Esses dados corroboram nossos achados em que a administração isolada de α -h-CRF₉₋₄₁ não foi capaz de promover alteração no IAPQ.

Considerando que o CRF está primariamente relacionado com respostas relacionadas ao estresse, Bardin e cols. (2009) sugeriram que a modulação dual do CRF no sistema nociceptivo possa estar diretamente relacionada com o efeito anti e pró-nociceptivo observado em situações emocionais (GAMARO e cols., 1998). De fato, a antinocicepção do estresse agudo é amplamente conhecida em animais e humanos (AMIT e GALINA, 1986). Por outro lado, acredita-se que o estresse crônico promova hiperalgesia ou alodinia (GAMARO e cols., 1998). Estudo de Roltsch e cols. (2014) mostrou que a hiperalgesia induzida por estresse em ratos expostos ao odor do predador pode ser devido a aumento da sinalização de CRF em receptores CRF₁, já que a administração sistêmica de antagonista seletivo para receptores CRF₁ reduziu a sensibilidade nociceptiva térmica no teste de Hargreaves. Em contrapartida, Abdelhamid e cols. (2013) demonstraram que a hiperalgesia músculo-esquelética resultante de estresse por nado forçado é mediada em parte por receptores CRF₂, visto que o pré-tratamento com astressin 2B, antagonista de receptor CRF₂, mas não com NBI-35965, antagonista de receptor CRF₁, atenuou essa hiperalgesia. Dessa forma ainda são necessários estudos para melhor entender o funcionamento desse mecanismo modulatório.

Em conclusão nossos resultados sugerem que a administração de agonista não específico para receptores CRF no CEA possa modular a sensibilidade mecânica secundária avaliada no teste da placa quente em animais sem e com inflamação persistente das ATMs.

VI. CONCLUSÃO

Fundamentado nos resultados obtidos neste trabalho podem ser sumarizadas as seguintes conclusões:

- A inflamação persistente das ATMs induzida por CFA é capaz de promover alodinia mecânica diminuindo o limiar de retirada frente a estímulo mecânico inócuo no teste de Von Frey, e hiperalgesia secundária, evidenciada pela diminuição do IA no teste da placa quente. Ainda possui efeito ansiogênico avaliado no teste do labirinto em cruz elevado, evidenciado pela diminuição do tempo de permanência e do número de entradas nos braços abertos.
- Em situações de estresse agudo é possível observar analgesia no teste de placa quente de animais sem inflamação persistente das ATMs. Ainda, o EA foi capaz de reverter a alodinia mecânica e a hiperalgesia secundária, pelo menos em parte, induzidos pelo CFA intra-articular, porém não alterou o efeito ansiogênico nos animais com inflamação crônica das ATMs.
- Estresse crônico, repetido e variado, promoveram hiperalgesia no teste de placa quente de animais sem inflamação persistente das ATMs, porém não alteraram a hiperalgesia secundária induzida pelo CFA intra-articular. Ainda, o ECR e ECV não alteraram o efeito ansiogênico da administração intra-articular de CFA, porém o ECV demonstrou efeito ansiogênico nos animais sem inflamação crônica das ATMs.
- A administração do antidepressivo tricíclico, inibidor da recaptação de serotonina e noradrenalina, imipramina, reverteu a hiperalgesia causada pela administração de CFA intra-articular, exercendo dessa forma efeito analgésico, bem como reduziu o efeito ansiogênico causado pelo CFA intra-articular.
- A ativação de receptores para CRF no CEA promoveu analgesia nos animais sem inflamação das ATMs e ainda reverteu a hiperalgesia causada pela administração intra-articular do CFA.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, F.V.; MELACK, R.; SAMUEL, C. Morphine analgesia in tail-flick and formalin pain tests are mediated by different neural systems. *Experim Neurol*, 75: 644-65, 1982.
- ABDELHAMID, R.E.; KOVACS, K.J.; PASLEY, J.D.; NUNES, M.G.; LARSON, A.A. Forced swim-induced musculoskeletal hyperalgesia is mediated by CRF2 receptors but not by TRPV1 receptors. *Neuropharmacol*, 72: 29-37, 2013.
- ADELL, A., CASANOVAS, J. M., ARTIGAS, F. Comparative study in the rat of the action of different types of stress on the release of 5-HT in raphe nuclei and forebrain areas. *Neuropharmacol*, 36: 735-741, 1997.
- AGUGLIA, M.; BASBAUM, A.I.; JESSEL, T.M. Neurophysiology of pain. *Neurological Sciences*, v. 24, sup. 2, 57 - 60, 2003.
- ALDENHOFF, J.B.; GRUOL, D.L.; RIVIER, J.; VALE, W.; SIGGINS, G.R. Corticotropin releasing factor decreases postburst hyperpolarizations and excites hippocampal neurons. *Science*, 221: 875-877, 1983.
- ALMEIDA, T.F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. *Brain Res.*, 1000: 40-56, 2004.
- AMBALAVANAR, R., MOUTANNI, A., DESSEM, D. Inflammation of craniofacial muscle induces widespread mechanical allodynia. *Neurosc Lett*, 399: 249-254, 2006.
- AMIT, Z.; GALINA, Z.H. Stress-induced analgesia: adaptive pain suppression. *Physiol Behav*, 66: 1091-1120, 1986.
- BARDIN, L.; Malfetes, N.; NEWMAN-TANCREDI, A.; DEPOORTERE, R. Chronic restraint stress induces mechanical and cold allodynia, and enhances inflammatory pain in rat: Relevance to human stress-associated painful pathologies. *Behav Brain Res*, 205: 360-366, 2009.
- BARON, R. Peripheral neuropathic pain: from mechanisms to symptoms. *Clin J Pain*, 16: S12-S20, 2000.
- BASBAUM, A. I.; FIELDS, H. L. Endogenous pain control mechanisms: review and hypothesis. *Annu. Neurol*, 4: 451-462, 1978.
- BASBAUM, A.I.; FIELDS, H.L. Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. *Ann Rev Neurosci*, 7: 309-338, 1984.
- BEE, L.; DICKENSON, A. Descending modulation of pain. In: *Synaptic Plasticity in Pain*. Springer, 307-335, 2009.
- BELL, W. E. Orofacial pains. Classification, diagnosis, management. 4th ed. Chicago: Year Book Medical Publishers, 1989.
- 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.
- BERNARD, J. F., PESCHANSKI, M., BESSON, J. M. A possible spino(trigemino)pontoamygdaloid pathways for pain. *Neurosci Lett.*, 100: 83-88, 1989.
- BERNARD J. F., ALDEN M., BESSON, J. M. The organization of the efferent projections from the pontine parabrachial area to the amygdaloid complex: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHA-L) study in the rat. *J Comp Neurol*, 329: 201-229, 1993.
- BESTER, H., MENENDEZ, L., BESSON, J. M., BERNARD, J. F. The spino(trigemino)parabrachiohypothalamic pathways: electrophysiological evidence for an involvement in pain processes. *J Neurophysiol*, 73: 568-585, 1995.
- BIANCHI, M., PANERAI, A. E. CRH and the noradrenergic system mediate the antinociceptive effect of central interleukin-1 α in the rat. *Brain Res Bull*, 36: 113-117, 1995.
- BODNAR, R. J., GLUSMAN, M., BRUTUS, M., SPIAGGIA, A., KELLY, D. D. Analgesia induced by cold-water stress: attenuation following hyphophysectomy. *Physiol Behav*, 23: 53-62, 1979.
- BODNAR, R.J. Supraspinal circuitry mediating opioid antinociception: antagonist and synergy studies in multiple sites. *J. Biomed. Sci*, 7(3): 181-94, 2000.

- BOLLES, R. C., FANSELOW, M. S. A perceptual-defensive-recuperative model of fear and pain. *Behav Brain Sci*, 3: 291-301, 1980.
- BRAGDON, E. E., LIGHT, K. C., COSTELLO, N. L., SIGURDSSON, A., BUTING, S., BHALANG, K., MAIXNER, W. Group differences in pain modulation: pain free women compared to pain free men and to women with TMD. *Pain*, 96: 227 – 237, 2002.
- BRANDÃO, M.L. Mecanismos Básicos e Aspectos Motivacionais da Dor. Em: *As bases biológicas do comportamento: introdução à neurociência*. EPU (editora). São Paulo, 141-157, 2004.
- BROOM, B., MEIER, W., SCHAREIN, E. Imipramine reduces experimental pain. *Pain*, 25: 245-257, 1986.
- BROWN, G. A casual analysis of chronic pain and depression. *J Abnormal Physiol*, 99: 127-137, 1990.
- CACERES, C.; BURNS, J.W. Cardiovascular reactivity to psychological stress may enhance subsequent pain sensitivity. *Pain*, 69: 237-244, 1997.
- CAMELO, S.H.; ANGERAMI, E.L. Symptoms of stress in workers from five family health centers. *Rev Lat Am Enfermagem*, 12: 14-21, 2004.
- CARLESSON, 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.
- CARLSSON, C.R.; REID, K.I.; CURRAN, S.L.; STUDTS, J.; OKESON, J.P.; FALACE, D. Psychological and physiological parameters of masticatory muscle pain. *Pain*, 76: 297-307, 1998.
- CARLSSON, G. E., DEBOEVER, J. A. *Epidemiology*. In: *Temporomandibular joint and masticatory muscle disorders*. ZARB, G. A., CARLSSON, G. E., SESSLE, B. J., MOHL, N. D. editors. Copenhagen: Munksgaard, p. 165, 1994.
- CASTILHO, V.M.; MACEDO, C.E.; BRANDÃO, M.L. Role of benzodiazepine and serotonergic mechanisms in conditioned freezing and antinociception using electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray as unconditioned stimulus in rats. *Psychopharmacology*, 165: 77-85, 2002.
- CEPEDA, M.S.; BONNEY, I.; MOYANO, J.; CARR, D.B. Corticotropin releasing hormone (CRH) produces analgesia in a thermal injury model independent of its effects on systemic beta-endorphin and corticosterone. *Regul Pept*, 118: 39-43, 2004.
- CHAPMAN, C. R., TURNER, J. A. Psychological control of acute pain in medical settings. *J Pain Symptom Manage*, 1: 9-20, 1986.
- CHEN, R., LEWIS, K. A., PERRIN, M. H., VALE, W. W. Expression cloning of a human corticotropin-releasing factor receptor. *Proc Natl Acad Sci*, 90: 8967-8971, 1993.
- CHEN, X.; GREEN, P. G.; LEVINE, J.D. Stress enhances muscle nociceptor activity in the rat. *Neuroscience*, 185: 166-173, 2011.
- CHESHER, G. B., CHAN, B. Foot shock induced analgesia in mice: its reversal by naloxone and cross tolerance with morphine. *Life Sci*, 21: 1569-1574, 1977.
- 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.
- CORNÉLIO, A.M.; NUNES-DE-SOUZA, R.L. Open elevated plus maze-induced antinociception in rats: a non-opioid type of pain inhibition? *Physiol. Behav*, 96: 440-447, 2009.
- CORTELLI, P.; PIERANGELI, G. Chronic pain-autonomic interactions. *Neurological Sciences*, 24(2): 68 - 70, 2003.
- CUI, X. Y., LUNDEBERG, T., YU, L. C. Role of corticotrophin-release factor and its receptor in nociceptive modulation in the central nucleus of amygdale in rats. *Brain Res*, 995: 23-28, 2004.

- CURZON, G.; HUTSON, P.H.; KENNETT, G.A.; MARCOU, M. Characteristic of Analgesia Induced by Brief or Prolonged Stress. *Annu NY Acad Sci*, 93-101, 1997.
- DA SILVA TORRES, I. L., CUCCO, S. N. S., BASSANI, M., DUARTE, M. S., SILVEIRA, P. P., VASCONCELLOS, A. P., TABAJARA, A. S., DANTAS, G., FONTANELLA, F. U., DALMAZ, C., FERREIRA, M. B. C. Long-lasting delayed hyperalgesia after chronic restraint stress in rats – effect of morphine administration. *Neuros Re.*, 45: 277-283, 2003.
- DANIELSEN, E. K., MAGNUSON, D. J., GRAY, T. S. The central amygdaloid nucleus innervations of the dorsal vagal complex in rat: a phaseolus vulgaris leucoagglutinin lectin anterograde tracing study. *Brain Res Bull*, 22: 705-715, 1989.
- DAUTZENBERG, F.M., HAUGER, R.L. The CRF peptide family and their receptors: yet more partners discovered. *Pharmacol Science*, 23: 71-76, 2002.
- DENUCCI, D.J., DIONNE, R.A., DUBNER, R. Identifying a neurobiologic basis for drug therapy in TMDs. *J Am Dent Assoc*, 27: 581-593, 1996.
- DESCARTES, R. (1644). *L'Homme*. In *Lectures of Physiology During the 16th, 17th and 18th Cenuries* (translated by M. Foster, 1901). Cambrige: Cambrige University Press.
- DONATTI, A.F.; LEITE-PANISSI, C.R.A. Activation of the coticotropin releasing-factor receptor from the basolateral or central amygdala modulates nociception in guinea pigs. *Adv Biosci Biothec*, 4: 20-27, 2013.
- DOSTROVSKY, O.J.; CRAIG, A.D. Ascending projection system. In: McMAHOM, S.B.; KOLTZENBURG, M. (Eds.). *Wall and Melazck's textbook of pain*. 5th ed. Churchill Livinstore: Elsevier, 2006, p.187.
- DUBNER, R., RUDA, M. A. Activity dependent neuronal plasticity following tissue injury and inflammation. *Trends Neurosci*, 15: 96-102, 1992.
- DUBRUL, E. The craniomandibular articulation. In: Sicher's *Oral Anatomy*. 7th ed. St Louis: Mosby, p. 147-209, 1980.
- DUNN, A. J, BERRIDGE, C. W. Physiological and behavioral responses to corticotropin-realising factor administration: is CRF a mediator of anxiety or stress responses? *Brain Res Rev*, 15: 71-100, 1990.
- DUBUISSON, P.; DENNIS, S.G. The formalin test: a quantitative study of the analgesia effects of morphine, mepedine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain*, 4: 161-174, 1977.
- DWORKIN, S. F., HUGGINS, K. H., LERESCHE, L., VON KORFF, M., HOWARD, J., TRUELOVE, E. Epidemiology of signs and symptoms in temporomandibular disorders: clinical signs in cases and controls. *J Am Dent Assoc*, 120: 273-281, 1990.
- EVASKUS, D. S.; LASKIN, D. M. A biochemical measure of stress in patients with myofascial pain-dysfunction syndrome. *J Dent Res*, Washington, v. 51, p. 1464-1466, 1972.
- FANSELOW, M.S. The midbrain periaqueductal gray as a coordinator of action in responsive to fear and anxiety. In: DEPAULIS, A; BANDLER, R. (Eds.). *The Midbrain Periaqueductal Gray Matter*. New York: Plenum Press, 151-173, 1991.
- FARDIN, V.; OLIVEIRAS, J.L.; BESSON, J.M. A reinvestigation of the analgesic effects induced by stimulation of the periaqueductal gray matter in the rat. *Brain Res*, 306: 105-123, 1984.
- FIELDS, H. L., BASBAUM, A. I. Central nervous system mechanisms of pain modulation, in: WALL, P. D., MELZACK, R. (Eds), *Textbook of Pain*, Churchill Livingstone press, Edinburgh, 243-257, 1994.
- FIELDS, H.L.; BASBAUM, A.I.; HEINRICHER, M.M. Central nervous system mechanisms of pain modulation. In: McMAHOM, S.B.; KOLTZENBURG, M. (Ed.). *Wall and Melzack's textbook of pain*. 5th. ed. Churchill Livingstore: Elsevier, 2006. P. 125-142.
- FILLINGIM, R. B., FILLINGIM, L. A., MOLLINS, M., SIGURDSSON, A., MAIXNER, W. Generalized vibrotactile allodynia in a patient with temporomandibular disorder. *Pain*, 78: 75-78, 1998.

- FOLKOW, B., HALLBACK-NORDLANDER, M., MARTNER, J., NORDBORG, C. Influence of the amygdale lesion on cardiovascular responses to alerting stimuli, on behavior and on blood pressure development in spontaneously hypertensive rats. *Acta Physiol. Scan*, 116: 133-139, 1982.
- GALENO, T. M., VAN HOESEN, G. W., BRODY, M. J. Central amygdaloid nucleus lesion attenuates exaggerated hemodynamic responses to noise stress in the spontaneous hypertensive rat. *Brain Res*, 291: 249-259, 1984.
- GAMARO, G. D., XAVIER, M. H., PILGER, J. A., ELY, D. R., DALMAZ, C. The effect acute and repeated restraint stress on the nociceptive response in rats. *Physiol. Behav*, 63: 693-697, 1998.
- GAMEIRO, G. H., ARTHURI, M. T., TAMBELI, C. H., DE ARRUDA VEIGA, M. C. Effects of ethanol on deep pain evoked by formalin injected in TMJ of rat. *Life Sci*, 73: 3351-3361, 2003.
- GAMEIRO, G. H., ARTHURI, M. T., TAMBELI, C. H., DE ARRUDA VEIGA, M. C. Influence of ethanol and morphine on pain perception evoked by deep tissue injury. *Braz J Pharm Sci*, 40: 317-325, 2004.
- GAMEIRO, G. H., ANDRADE, A. S., CASTRO, M., PEREIRA, L. F., TAMBELI, C. H., DE ARRUDA VEIGA, M. C. The effects of restraint stress on nociceptive responses induced by formalin injected in rat's TMJ. *Pharmacol Biochem Behav*, 82: 338-344, 2005.
- GAMEIRO, G. H., ANDRADE, A. S., NOUER, D. F., DE ARRUDA VEIGA, M. C. How many stressful experiences contribute to the development of temporomandibular disorders? *Clin Oral Invest*, 10: 261-268, 2006 a.
- GAMEIRO, G. H., GAMEIRO, P. H., ANDRADE, A. S., PEREIRA, L. F., ARTHURI, M. T., DE ARRUDA VEIGA, M. C. Nociception- and anxiety-like behavior in rats submitted to different periods of restraint stress. *Physiol Behav*, 15: 643-649, 2006 b.
- GATCHEL, R. J., GAROFALO, J. P., ELLIS, E., HOLT, H. Major psychological disorders in acute and chronic TMD: an initial examination. *J Am Dent Ass*, 127: 1365-1374, 1996.
- GEISSLER, P. R. An investigation of the stress factor in the mandibular dysfunction syndrome. *J Dent*, 13: 283-287, 1985.
- GIESLER, G. J. The spino-hypothalamic tract. In: Forebrain areas involved in pain processing. Besson, J-M; Guildbaud, G and Ollat, H (Eds.). Paris: Eurotext, 13-25, 1995.
- GOULET, L. P., LAVIGNE, G. J., LUND, J. P. Jaw positioning prevalence among French speaking Canadian in Québec and relates symptoms of temporomandibular disorders. *J Dent Res*, 74: 1738-1744, 1995.
- GRABOW, T. S., DOUGHERTY, P. M. Cervicomedullary intrathecal injection of morphine produces antinociception in the orofacial formalin test in the rat. *Anesthesiology*, 95: 1427-1434, 2001.
- GRACHEV, I.D.; APKARIAN, A.V. Anxiety in healthy humans is associated with orbital frontal chemistry. *Mol Psychiatry*, 5: 482-488, 2000.
- GRACHEV, I.D.; FREDRICKSON, B.E.; APKARIAN, A.V. Abnormal pain chemistry in chronic back pain: an in vivo proton magnetic resonance spectroscopy study. *Pain*, 89: 7-18, 2000.
- GRAEFF, F. G., NETO, C. F., ZAGROSSI, H. Jr. The elevated T-maze as an experimental model of anxiety. *Neurosci Biobehav Rev*, 23: 237-46, 1998.
- GUO, W.; ZOU S.; GUAN Y.; IKEDA, T.; TAL, M.; DUBNER, R.; REN K. Tyrosin phosphorylation of the NR2B subunit of the NMDA receptor in the spinal cord during the development and maintenance of inflammatory hyperalgesia. *J Neurosci*, 22: 6208-6217, 2002.
- HABIB, K. E., GOLD, P. W., CHROUSOS, G. P. Neuroendocrinology of stress. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 30: 695-728, 2001.
- HANSDOTTIR, R., BAKKE, M. Joint tenderness, jaw opening, chewing velocity, and bite force in patients with temporomandibular joint pain and matched healthy control subjects. *J Orofac Pain*, 18: 108-113, 2004.

- HARGREAVES, K.M.; FLORES, C.D.; MUELLER, G. The role of pituitary β -endorphin in mediating CRF-induced antinociception. *Amer J Physiol*, 258: 235-242, 1990.
- 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 Osteoarthritis Res Soc International*, 9: 619-624, 2001.
- 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 Dent Res*, 79: 1704-1711, 2000.
- HASS, D. A., NAKANISHI, O., MACMILLAN, R. E., JORDAN, R. C., HU, J. W. Development of an orofacial model of acute inflammation in the rat. *Arch Oral Biol*, 37: 417-422, 1992.
- HAUGER, R. L., DAUTZENBERG, F. M. Regulation of stress response by corticotropin releasing factor receptors. In, *Neuroendocrinology in Physiology and Medicine* (Conn, P.M. and Freedman, M. E., eds), pp, 261-286, Humana Press, 1999.
- HAULICĂ, I., NEAMTU, C., STRATONE, A., PETRESCU, G. H., BRANISTEANU, D., ROSCA, V., SLATINEANU, S. Evidence for the involvement of cerebral rennin-angiotensin system (RAS) in stress analgesia. *Pain*, 27: 237-245, 1986.
- HEINRICHER, M.M.; INGRAM, S.L. The brainstem and nociceptive modulation. In: BUSHNELL, M.C; BASBAUM, A.I. (Ed.). *The senses, a comprehensive reference. Pain*. Academic Press: San Diego, 2008. 5.v. p. 593-626.
- HERMANSON, O., BLOMQVIST, A. Subnuclear localization of FOS-like immunoreactivity in the rat parabrachial nucleus after nociceptive stimulation. *J Comp Neurol*, 368: 45-56, 1997.
- HYLDEN, J. L. K., NAHIN, R. L., TRAUB, R. J., DUBNER, R. Expansion of receptive fields of spinal lamina I projection neurons in rats with unilateral adjuvant-induced inflammation: the contribution of dorsal horn neurons mechanisms. *Pain*, 37: 229-243, 1989.
- HRISHNAN, K., FRANCE, R., PELTON, S., MCCANN, U., DAVIDSON, J., URBAN, B. Chronic pain and depression II Symptoms of anxiety in chronic low back pain patients and their relationship to subtypes of depression. *Pain*, 22: 289-294, 1985.
- IMBE, H., REN, K. Orofacial deep and cutaneous tissue inflammation differentially upregulates preprodynorphin mRNA in the trigeminal and paratrigeminal nuclei of the rat. *Mol Brain Res*, 37: 87-97, 1999.
- 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 Tissues Organs*, 169: 238-247, 2001.
- IMBE, H., MURAKAMI, S., OKAMOTO, K., IWAI-LIAO, Y., SENBA, E. The effects of acute and chronic restraint stress on activation of ERK in the rostral ventromedial medulla and locus coeruleus. *Pain*, 112: 361-371, 2004.
- IMBE, H., IWAI-LIAO, Y., SENBA, E. Stress induced hyperalgesia: animal models and putative mechanisms. *Front Biosci*, 11: 2179-2192, 2006.
- IMBE, H., OKAMOTO, K., DONISHI, T.; SENBA, E.; KIMURA, A. Involvement of descending facilitation from the rostral ventromedial medulla in the enhancement of formalin-evoked nocifensive behavior following repeated forced swim stress. *Brain Res*, 139: 103-112, 2010.
- 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.
- JAYARAM, A., SINGH, P., CAP, H. M. An enkephalinase inhibition. SCH 3615, arguments analgesia induced by surgery in mice. *Anesthesiology*, 82: 1283-1287, 1995.

- JJ, G.; NEUGEBAUER, V. Pro-and anti-nociceptive effects of corticotropin-releasing factor (CRF) in central amygdala neurons are mediated through different receptors. *J. Neurophysiol*, 99: 1201-1212, 2008.
- JOHN, M. T., MIGLIORETTI, D. L., LERESCHE, L., VON KORFF, M., CRITCHLOW, C. W. Widespread pain as a risk factor for dysfunctional temporomandibular disorder pain. *Pain*, 102: 257-263, 2003.
- JONES, D. A., ROLLMAN, G. B., BROOKE, R. L. The cortisol response to psychological stress in temporomandibular dysfunction, *Pain*, 72: 171-182, 1997.
- JORUM, E. Analgesia or hyperalgesia following stress correlates with emotional behavior in rats. *Pain*, 1988; 32: 341-348.
- JULIUS, D.; BASBAUM, A.I. Molecular Mechanisms of Nociception. *Nature*, 413: 203-210, 2001.
- KAGEYAMA, K., ECOLS. Urocortin messenger ribonucleic acid: tissue distribution in the rat and regulation in thymus by lipopolysaccharide and glucocorticoids. *Endocrinology*, 140: 5651-5658, 1999.
- KARP, J.F.; SHEGA, J.W.; MORONE, N.E.; WRINER, D.K. Advances in understanding the mechanisms and management of persistent pain in older adults. *Br J Anaesth*, 101: 111-120, 2008.
- KATZ, J.O.; RUGH, J.D.; HATCH, J.P.; LANGLAIS, R.P.; TEREZHALMY, G.T.; BORCHERDING, S.H. Effect of experimental stress on masseter and temporalis muscle activity in human subjects with temporomandibular disorders. *Arch Oral Biol*, 34: 393-398, 1989.
- KENNET, G. A., DOURISH, C. T., CURZON, G. Antidepressant-like action of 5-HT_{1A} agonists and conventional antidepressants in an animal model of depression. *Europ J Pharmacol*, 134: 265-274, 1987.
- KIRBY, L. G., ALLEN, A. R., LUCKI, I. Regional differences in the effects of forced swimming on extracellular levels of 5-hydroxytryptamine acetic acid. *Brain Res*, 682: 189-196, 1995.
- KLERMAN, E.B.; GOLDENBERG, D.L.; BROWN, E.N.; MALISZEWSKI, A.M.; ADLER, G.K. Circadian rhythms of women with fibromyalgia. *J Clin Endocrinol Metab*, 86: 1034-1039, 2001.
- KNUSTSSON, K., HASSELGREN, G., NILNER, M., PETERSSON, A. Craniomandibular disorders in chronic orofacial pain patients. *J Craniomandib Disord*, 3: 15-19, 1989.
- KOOB, G. F., HEINRICHS, S.C. A role for corticotrophin releasing factor and urocortin in behavioral responses to stressors. *Brain Res*, 848: 141-152, 1999.
- KORZUN, A., HINDERSTEIN, B., WONG, M. Comorbidity of depression with chronic facial pain and temporomandibular disorders. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 82: 496-500, 1996.
- KORZUN, A., YOUNG, E.A.; SINGER, K.; CARLSON, N.E.; BROWN M.B.; CROFFORD, L. Basal circadian cortisol secretion in women with temporomandibular disorders. *J Dent Res*, 81: 279-283, 2002.
- 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.
- LARIVIERE, W. R., MELZACK, R. The role corticotrophin-releasing factor in pain and analgesia. *Pain*, 84: 1-12, 2000.
- LASKIN, D. M. Etiology of the pain-dysfunction syndrome. *J Am Dent Assoc*, 79: 147-153, 1969.
- LEITE-PANISSI, C.R.A.; RODRIGUES, C.L; BRENTAGANI, M.R.; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, L. Endogenous opiate analgesia induced by tonic immobility in guinea pigs. *Braz. J. Med. Biol*, 34: 245-250, 2001.
- LEITE-PANISSI, C. R. A., BRENTAGANI, M. R., OLIVEIRA, L. M. Cholinergic-opioidergic interaction in the central amygdala induces antinociception in the guinea pig. *Braz J Med Biol Res*, 37: 1571-1579, 2004.
- LENT, R. Os sentidos do corpo: Estrutura e função do sistema somestésico. In: LENT, R. (Ed.). *Cem bilhões de neurônios: Conceitos fundamentais*. São Paulo: Atheneu, 2001. p. 209-239.
- LEWIS, J. W., CANNON, J. F., LIEBESKIND, J.C. Opioid and nonopioid mechanisms of stress analgesia. *Science*, 1980.

- LINDROTH, J.E.; SCHIMIDT, J.E.; CARLSON, C.R. A comparison between masticatory muscle pain patients and intracapsular pain patients on behavioral and psychosocial domains. *J Orofac Pain*, 16: 277-283, 2002.
- LIPP, M. Mecanismos neuropsicofisiológicos do stress: teorias e aplicações clínicas. 1 ed. São Paulo: casa do psicólogo, 2003.
- 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, 2002.
- MA, W., PESCHANSKI, M. Spinal and trigeminal projections to the parabrachial nucleus in the rat: electron-microscopic evidence of a spino-ponto-amygdalian somatosensory pathway. *Somatos Res*, 5: 247-257, 1988.
- MAGNI, G. The use of antidepressants in the treatment of chronic pain. *Drugs*, 42: 730-748, 1991.
- MAGNUSSON, T., EGERMARK, I., CARLSSON, G. E. A longitudinal epidemiologic study of signs and symptoms of temporomandibular disorders from 15 to 35 years of age. *J Orofac Pain*, 14: 310-319, 2000.
- MAIXNER, W., FILINGIM, R., BOOKER, D., SIGRDSSON, A. Sensitivity of patients with painful temporomandibular disorders to experimentally evoked pain. *Pain*, 63: 341-351, 1995.
- MAIXNER, W., FILINGIM, R., SIGRDSSON, A., KINCAID, S., SILVA, S. Sensitivity of patients with painful temporomandibular disorders to experimentally evoked pain: evidence for altered temporal summation of pain. *Pain*, 76: 71-81, 1998.
- MALEKI, N., GARJANI, A., NAZEMIYEH, H., NILFOUROUSHAN, N., EFTEKHAR, SADAT, A., ALLAMECH, Z., HASANNIA, N. Potent anti-inflammatory activities of hydroalcoholic extract from aerial parts of *Stachys inflata* on rats. *J Ethnopharmacol*, 75: 213-218, 2001.
- MAMET, J.; LAZDUNSKI, M.; VOILLEY, N. How nervy grown factor drives physiological and inflammatory expressions of acid-sensing in channel 3 in sensory neurons. *J Biol Chem*. 278(48): 48907-48913, 2003.
- MARQUEZ, J. O. Dor Diagnóstico e Tratamento. Bases de Anatomia e Fisiopatologia. Vol.I, nº I, 2004.
- MASON, P., GAO, K. Raphe magnus serotonergic neurons tonically modulate nociceptive transmission. *Pain Forum*, 7: 143-150, 1998.
- MATSUZAWA-YANAGIDA, K.; NARITA, M.; NAKAJIMA, M.; KUZUMAKI, N.; NIKURA, K.; NOZAKI, H.; TAKAGI, T.; TAMAI, E.; HAREYAMA, N.; TERADA, M.; YAMAZAKI, M.; SUZUKI, T. Usefulness of antidepressants for improving the neuropathic pain-like state and pain-induced anxiety through actions at different brain sites. *Neuropsychopharmacology*, 33: 1952-1965, 2008.
- MCCREARY, C. P., CLARK, G. T., MERRIL, R. L., FLACK, V., OAKLEY, M. E. Psychological distress and diagnostic subgroups of tempromandubular disorder patients. *Pain*, 44: 29-34, 1991.
- MCNEILL, C. Temporomandibular disorders. Guidelines for classification, assessment and management. Chicago: Quintessence. 87, 1993.
- MEIKEL, M. C. Remodeling. In: *The temporomandibular joint: a biological basis for clinical practice*. 4th ed. Philadelphia: Saunders, p. 93-107, 1992.
- MELZACK, R.; WALL, P.D. Pain mechanisms: a new theory. *Science*, 150: 971-979, 1965.
- MICZEK, K. A., THOMPSON, M. L., SCHUTER, L. Analgesia follow defeat in an aggressive encounter: development of tolerance in opioid receptors. *Ann NY Acad Sci*, 467: 14-29, 1986.
- MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol*, 57: 1-164, 1999.
- MILLAN, M.J. Descending control of pain. *Prog Neurobiol*, 66: 355-474, 2002.
- MILLAN, M.J.; PRZEWOLOCKI, R.; HERZ, A. A non-beta-endorphinergic adenohipophyseal mechanism is essential for an analgesic response to stress. *Pain*, 8: 343-353, 1980.

- MILLER, K., DOUGLAS, V., RICHARDS, A., CHANDLER, M., FOREMAN, R. Propriospinal neurons in the C1 – C2 spinal segments projects to the L5 – S1 segments of the rat spinal cords. *Brain Res Bull*, 47: 43-47, 1998.
- MOCHIZUCKI, D. Serotonin and noradrenalin reuptake inhibitors in animal models of pain. *Hum Psychopharmacol Clin Exp*, 19: 15-19, 2004.
- MONTGOMERY, K. C. The relationship between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. *J Comp Physiol Psychol*, 48: 254-260, 1955.
- MORIWAKI, K., YUGE, O. Topographic features of cutaneous tactile hypoesthetic and hyperesthetic abnormalities in chronic pain. *Pain*, 81: 1-6, 1999.
- MOULTON, R.E. Psychiatric considerations in maxillofacial pain. *J Am Dent Assoc*, 51: 408-414, 1955.
- MOUSA, S., MILLER JR, C.H., COURI, D. Corticosteroid modulation and stress-induced analgesia in rats. *Neuroendocrinol*, 1981; 33: 317-319.
- MYERS, B.; DITTMAYER, K.; GREENWOOD-VAN MEERVELD, B. Involvement of amygdaloid corticosterone in altered visceral and somatic sensation. *Behav Brain Res*, 181: 163-167, 2007.
- NASCIMENTO, G.C; LEITE-PANISSI, C.R.A. Time-dependent analysis of nociception and anxiety-like behavior in rats submitted to persistent inflammation of the temporomandibular joint. *Physiol Behav*, 125: 1-7, 2014.
- OKAMOTO, K., KIMURA, A., DONISHI, T., IMBE, H., GODA, K., KAWANISHI, K., TAMAI, K., SENBA, E. Persistent monoarthritis of the temporomandibular joint region enhances nocifensive behavior and lumbar spinal Fos expression after noxious stimulation to the hindpaw in rats. *Exp Brain Res*, 170: 358-367, 2006.
- OKESON, J. P. Dor orofacial – Guia para avaliação, diagnóstico e tratamento. 1ª ed. Quintessence, 1998.
- OLIVEIRA, M. C., PARADA, C. A., VEIGA, M. C.; RODRIGUES, 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.
- PACAK, K., PALKOVITS, M. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocr Rev*, 22: 502-548, 2001.
- PADOVAN, C. M., GUIMARÃES, F. S. Restraint-induced hypoactivity in an elevated plus maze. *Braz J Med Bio Res*, 33: 79-83, 2000.
- PALCHAUDHURI, M. R.; E COLS. Isolation and pharmacological characterization of two functional splice variants of corticotropin releasing factor type 2 receptor from *Tupaia belangeri*. *J Neuroendocrinol*, 11: 419-428, 1999.
- PARENT, A.J., BEUADET, N.; BEAUDRY, H.; BERGERON, J.; BÉRUBÉ, P.; DROLET, G. Increased anxiety-like behaviors in rats experiencing chronic inflammatory pain. *Behav Brain Res*, 229: 160-167, 2012.
- 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.
- PELLOW, S., CHOPIN, P., FILE, S., BRILEY, M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 14: 149-167, 1985.
- PERRIN, M. H., DONALDSON, C. J., CHEN, R., BLOUNT, A., BERGGREN, T., BILEZIKJIAN, L., SAWCHENKO, P., VALE, W. W. Identification of a second CRF receptor gene and characterization of a cDNA expressed in heart. *Proc Natl Acad Sci*, 92: 2969-2973, 1995.
- POREE, L.R.; DICKENSON, A.H.; WEI, E.T. Corticotropin-releasing factor inhibits the response of trigeminal neurons to noxious heat. *Brain Res*, 502: 349-355, 1989.
- PORRECA, F.; OSSIPOV, M.H.; GEBHART, G.F. Chronic pain and medullary descending facilitation. *Trends Neurosci*, 25: 319-325, 2002.

- POTTER, E., SUTTON, S., DONLADSON, D., CHEN, R., PERRIN, M., LEWIS, K., SAWCHENKO, P. E., VALE, W. Distribution of corticotropin-releasing factor receptor mRNA expression in the rat brain and pituitary. *Proc Natl Acad Sci*, 91: 8777-8781, 1994.
- POVEDA-RODA, R., BAGÁN, J. V., DÍAZ-FERNÁNDEZ, J. M., HERNÁNDEZ-BAZÁN, S., JIMÉNEZ-SORIANO, Y. Review of temporomandibular joint pathology. Part I: Classification, epidemiology and risk factors. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 12: 292-298, 2007.
- PRADO, W.A.; FAGANELLO, F.A. The anterior pretectal nucleus participates as a relay station in the glutamate, but not morphine-induced antinociception from the dorsal raphe nucleus in rats. *Pain*, 88(2): 169-76, 2000.
- QUINTEIRO, L., MORENO, M., AVILA, C., ARCA YA, J., MAIXNER, W., SUAREZ-ROCA, H. Long-lasting delayed hyperalgesia after subchronic swim stress. *Pharmacol Biochem Behav*, 67: 449-458, 2000.
- QUINTEIRO, L., CUESTA, M. C., SILVA, J. A., ARCA YA, J., PINERUA-SUHAIBAR, L., MAIXNER, W., SUAREZ-ROCA, H. Repeated swim stress increases pain-induced expression of c-FOS in the rat lumbar cord. *Brain Res*, 965: 259-268, 2003.
- RAINVILLE, P. Brain mechanisms of pain affect and pain modulation. *Curr Opin Neurobiol*, 12: 195-204, 2002.
- REID, K. I., GRACELY, R. H., DUBNER, R. A. The influence of time, facial side, and location on pain-pressure thresholds in chronic myogenous temporomandibular disorder. *J Orofac Pain*, 8: 258-265, 1994.
- REN, K., DUBNER, R. Descending modulation in persistent pain: an update. *Pain*, 100: 1-6, 2002.
- RIVAT, C.; BECKER, C.; BLUGEOT, A.; ZEAU, B.; MAUBORGNE, A.; POHL, M.; BENOLIEL J.J. Chronic stress induces transient spinal neuroinflammation, triggering sensory hypersensitivity and long-lasting anxiety-induced hyperalgesia. *Pain*, 150: 358-368, 2010.
- RO, J.Y. Contribution of peripheral NMDA receptors in craniofacial muscle nociception and edema formation. *Brain Res*, 979: 78-84, 2003.
- ROLLMAN, G. B., GILLESPIE, J. M. The role of psychosocial factors in temporomandibular disorders. *Curr Rev Pain*, 4: 71-81, 2000.
- ROLTSCH, E. A.; BAYNES, B. B.; MAYEX, J. P.; WHITAKER, A. M.; BAIMONTE, B. A.; GILPIN, N. W. Predator odor stress alters corticotrophin-releasing factor-1 receptor (CRF1R)-dependent behavior in rats. *Neuropharmacol*, 79: 83-89, 2014.
- 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.
- RUGH, J.D.; WOODS, B.J.; DAHLSTROM, L. Temporomandibular disorders: assessment of psychological factors. *Adv Dent Res*, 7: 127-136, 1993.
- SALTER, M.W. Cellular neuroplasticity mechanisms mediating pain persistence. *J Orofac Pain* 18(4): 318-324, 2004.
- SANCHEZ, M. M.; ECOLS. Autoradiographic and *in situ* hybridization localization of corticotrophin-releasing factor 1 and 2 receptors in non-human primate brain. *J Comp Neurol*, 408: 365-377, 1999.
- SARLANI, E., GREENSPAN, J. D. Evidence for generalized hyperalgesia in temporomandibular disorders patients. *Pain*, 102: 221-226, 2003.
- SARLANI, E., GRACE, E., REYNOLDS, M., GREENSPAN, J. D. Evidence for up-regulated central nociceptive processing in patients with masticatory myofascial pain. *J Orofac Pain*, 18: 41 – 55, 2004.
- SERRA, J. Overview of neuropathic pain syndromes (new advances in the treatment of neuropathic pain). *Acta Neurol Scand* 100(S. 173): 7-11, 1999.
- SEYLE, H.A. Syndrome produced by diverse nervous agents. *Nature*, 1936.

- SAHEBGHARANI, M.; ZARRINDAST, M.R. Effect of alpha-adrenoceptor agents on imipramine-induced in nerve ligated mice. *Eur Neuropharmacol*, 11: 99-104, 2001.
- SHEKHAR, A., TRUIT, W., RAINNIE, D., SAJDYK, T. Role of stress, corticotrophin releasing factor (CRF) and amygdale plasticity in chronic anxiety. *Stress*, 08: 209-219, 2005.
- SCHUTZ, T. C. B., ANDERSEN, M. L., TUFIK, S. Sleep alterations in an experimental orofacial pain model in rats. *Brain Res*, 993: 164-171, 2003.
- SCHWABER, J. S., STERNINI, C., BRECHA, N. C., ROGERS, W. T., CARD, J. P. Neurons containing calcitonin gene-related peptide in the parabrachial nucleus project to the central nucleus of the amygdale. *J Comp Neurol*, 270: 416-426, 1988.
- SCOTT, B., JULL, G., STERLING, M. Widespread sensory hypersensitivity of a feature of chronic whiplash-associated disorder but not chronic idiopathic neck pain. *Clin J Pain*, 21: 175-181, 2005.
- SHI, M., WANG, J. Y., LUO, F. Depression shows divergent effects on evoked and spontaneous pain behaviors in rats. *J Pain*, 11: 219-229, 2010.
- SINNIGER, V.; PORCHER, C.; MOUCHET, P.; JUHEM, A.; BONAZ, B. C-fos and CRF receptor gene transcription in the brain of acetic acid-induced somato-visceral pain in rats. *Pain*, 110: 738-750, 2004.
- SIPILA, K., VEIJOLA, J., JOKELAINEN, M. R., OIKARINEN, K. S., RAUSTIA, A. M. Association between symptoms of temporomandibular disorders and depression: an epidemiological study of Northern Finland. *Birth Control Cranio*, 19: 183-187, 2001.
- SKORZEWSKA, A., BIDZINSKI, A., HAMED, A., LEHNER, M., TURZYNSKA, D., SOBOLEWSKA, A., MACIEJAK, P., SZYNDLER, J., WISLOWSKA-STANEK, A., PLAZNIK, A. The influence of CRF and α -helical CRF₍₉₋₄₁₎ on rat fear responses, c-FOS and CRF expression, and concentration of amino acids in brain structures. *Horm Behav*, 54: 602-612, 2008.
- SONG, Z.H.; TAKEMORI, A.E. Involvement of spinal kappa opioid receptors in the antinociception produced by intrathecally administered corticotropin-releasing factor in mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 254: 363-368, 1990.
- SOUZA, E. B. Corticotropin-releasing factor receptors: physiology, pharmacology, biochemistry and role in the central nervous system and immune disorders. *Psychoneuroendocrinology*, 20: 789-819, 1995.
- STEIN, C., MILLAN, M. J., HERZ, A. Unilateral inflammation of the hindpaw in rats as a model of prolonged noxious stimulation: alterations in behavior and nociceptive thresholds. *Pharmacol Biochem Behav*, 31: 445-451, 1988.
- SUVINEN, T. I., HANES, K. R., GRESCHMAN, J. A., READE, P. C. Psychophysical subtypes of temporomandibular disorders. *J Orofac Pain*, 11: 200-205, 1997.
- SUZUKI, R.; MORCUENDE, S.; WEBBER, M.; HUNT, S.P.; DICKENSON, A.H. Superficial NK1-expressing neurons control spinal excitability through activation of descending pathways. *Nat Neurosci*, 5: 1319-1326, 2002.
- SWANSON, L. W. *Brain Maps: Structure of the rat brain*. Elsevier: The Netherlands, 1992.
- TACHE, Y.; BONAZ, B. Corticotropin-releasing factor receptors and stress-related alterations of gut motor function. *J Clin Invest*, 117: 33-40, 2007.
- TACHE, Y.; MARTINEZ, V.; WANG, L.; MILLION, M. CRF1 receptor signaling pathways are involved in stress-related alterations of colonic function and viscerosensitivity: implications for irritable bowel syndrome. *Br. J Pharmacol*, 141: 1321-1330, 2004.
- TEIXEIRA, R.C.; ZANGROSSI, H.; GRAEFF, F.G. Behavioral effects of acute and chronic imipramine in the elevated T-maze model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav*, 65: 51-6, 2000.
- TEIXEIRA, M.J. Fisiopatologia da dor aguda e crônica. In: TEIXEIRA, M.J. (Ed.). *Dor: manual para o clínico*. São Paulo: Atheneu, 2006. P. 9-24.

- TERMAN, W., LEWIS, J. W., LIEBESKIND, J. C. Two opioid forms of stress analgesia: studies of tolerance and cross-tolerance. *Brain Res*, 368: 101-106, 1986.
- THILANDER, B., RUBIO, G., PENA, L., MAYORGA, C. Prevalence of temporomandibular dysfunction and its association with malocclusion in children and adolescents: an epidemiologic study relates to specified stages of dental development. *Angle Orthod*, 72: 146-154, 2002.
- TOOD, A.J.; KOERBER, H.R. Neuroanatomical substrates of spinal nociception. In: McMAHOM, S.B.; KOLTZENBURG, M. (Ed.). *Wall and Melzack's textbook of pain*. 5th ed. Elsevier: Churchill Livingstone, 2006. p. 73-90.
- TORRES, I. L., BONAN, C. D., CREMA, L., DE LEON NUNES, M., BATTASTINI, A. M., SARKIS, J. J., DALMAZ, C., FERREIRA, M. B. Effects of drugs active at adenosine receptors upon chronic stress-induced hyperalgesia in rats. *Eur J Pharmacol*, 481: 197-201, 2003a.
- TORRES, I. L., CUCCO, S. N., BASSANI, M., DUARTE, M., SILVEIRA, P. P., VASCONCELOS, A. P., TABAJARA, A. S., DANTAS, G., FONTELLA, F. U., DALMAZ, C., FERREIRA, M. B. Long-lasting delayed hyperalgesia after chronic restraint stress in rats – effect of morphine administration. *Neurosci Res*, 45: 277-283, 2003b.
- TRICKLEBANK, H. P. H., CURZON, G. Analgesia induced by brief or more prolonged differs in its dependency on naloxone, 5-hydroxytryptamine and previous testing of analgesia. *Neuropharmacol*, 23: 417-421, 1984.
- TURP, J. C., KOWALSKI, C. J., O'LEARY, N., STOHLER, C. S. Pain maps from facial pain patients indicate a broad pain geography. *J Dent Res*, 77: 1465-1472, 1998.
- ULRICH-LAI, Y. M.; XIE W.; MEIJ, J. T. A.; DOLGAS, C. M.; YU, L.; HERMAN, J. P. Limbic and HPA axis function in the animal model of chronic neuropathic pain. *Physiol Behav*, 88: 67-76, 2006.
- UZUKI, M., E COLS. Urocortin in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *Clin Sci*, 100: 577-589, 2001.
- VALENTINO, R.J.; FOOTE, S.L. Corticotropin-releasing factor disrupts sensory responses of brain noradrenergic neurons. *Neuroendocrinol*, 45: 28-36, 1987).
- VACCARINO, A. L., KASTIN, A. J. Endogenous opiates: 2000. *Peptides*, 22: 2257-328, 2001.
- VALE, W., SPIESS, J., RIVIER, C., RIVIER, J. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotrophin and beta endorphin. *Science*, 213: 1394-1397, 1981.
- VEENING, J. G., SWANSON, L. W., SAWCHENKO, P. E. The organization of projections from the central nucleus of amygdala to brainstem sites involved in central autonomic regulation: a combined retrograde transport-immunohistochemical study. *Brain Res*, 303: 337-357, 1984.
- VIT, J.P.; CLAUW, D.J.; MOALLEM, T.; BOUDAH, A.; OHAA, P.T.; JASMIN, L. Analgesia and hyperalgesia from CFR receptor modulation in the central nervous system of Fischer and Lewis rats. *Pain*, 121: 241-260, 2006.
- WATKINS, L. R., MAYER, D. J. Organization of endogenous opiate and nonopiate pain control systems. *Science*, 216: 1185-1192, 1982.
- WEI, F., DUBNER, R., REN, K. Nucleus reticularis gigantocellularis and nucleus raphe magnus in the brain stem exert opposite effects on behavioral hyperalgesia and spinal FOR protein expression after peripheral inflammation. *Pain*, 81: 215-219, 1999a.
- WEI, F., DUBNER, R., REN, K. Laminar-selective noradrenergic and serotonergic modulation includes spinoparabrachial cells after inflammation. *Neuroreport*, 10: 1757-1761, 1999b.
- WILLER, J.C., DEHEN, H., CAMBIER, J. Stress-induced analgesia in humans: endogenous opioid and naloxone reversible depression of pain reflexes. *Science*, 1981; 212: 689-691.
- WILLIAMS, D.W.JR.; LIPTON, J.M.; GIESECKE, A.H.JR. Influence of centrally administered peptides on ear withdrawal from heat in the rabbit. *Peptide*, 7: 1095-1100, 1986.

- WILLIS, W.D.; WESTLUND, K.N. Neuroanatomy of the pain system and of the pathways that modulate pain. *J. Clin. Neurophysiol*, 14(1): 2-31, 1997.
- WILLNER, P., TOWELL, A., SAMPSON, D., SOPHOKLEOUS, S., MUSCAT, R. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by tricyclic antidepressant. *Psychopharmacology*, 93: 358-364, 1987.
- WOOD, J.L.; RUSSO, A.F. Autoregulation of cell specific MAP kinase control of the tryptophan hydroxylase promoter. *J Biol Chem*, 276: 21262-21271, 2001.
- YAMADA, K., NABESHIMA, T. Stress-induced behavioral responses and multiple opioid systems in the brain. *Behav Brain Res*, 67: 133-145, 1995.
- YAMASAKI, Y., REN, K., SHIMADA, M., IWATA, K. Modulation of paratrigeminal nociceptive neurons following temporomandibular joint inflammations in rats. *Exp Neurol*, 214: 209-218, 2008.
- YARUSHKINA, N.I.; BAGAEVA, T.R.; FILARETOVA, L.P. Central corticotropin-releasing factor (CRF) may attenuate somatic pain sensitivity through involvement of glucocorticoids. *J Physiol Pharmacol*, 65: 541-548, 2011.
- ZARDETTO-SMITH, A.M., GRAY, T. S. Organization of peptidergic and catecholaminergic efferents from the nucleus of the solitary tract to the rat amygdala. *Brain Res Bull*, 25: 875-887, 1990.
- ZARRINDAST, M.R.; VALIZADEH, S.; SAHEBGHARANI, M. GABA (B) receptor mechanisms and imipramine-induced antinociception in ligated and non-ligated mice. *Eur J Pharmacol*, 407: 65-72, 2000.
- ZARRINDAST, M.R.; VOUSOOGHI, N.; SAHEBGHARANI, M. Imipramine-induced antinociception in the formalin test. Receptor mechanisms involved and effect of swim stress. *Pharmacol*, 68: 154-161, 2003.
- 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.
- ZIEGLGANSBERGER, W.; BERTHELE, A.; TOLLE, T.L. Understanding neuropathic pain. *CNS Spectrum* 10(4): 289-308, 2005.