

ALEX DE FREITAS RODRIGUES

**Efeitos da laserterapia no comportamento nociceptivo e na atividade neuronal
do núcleo trigeminal após lesão unilateral do disco da articulação
temporomandibular em ratos**

São Paulo

2016

ALEX DE FREITAS RODRIGUES

**Efeitos da laserterapia no comportamento nociceptivo e na atividade neuronal
do núcleo trigeminal após lesão unilateral do disco da articulação
temporomandibular em ratos**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas para obter o título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofaciais

Orientador: Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz

São Paulo

2016

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.

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Rodrigues, Alex de Freitas.

Efeitos da laserterapia no comportamento nociceptivo e na atividade neuronal do núcleo trigeminal após lesão unilateral do disco da articulação temporomandibular em ratos / Alex de Freitas Rodrigues ; orientador João Gualberto de Cerqueira Luz. -- São Paulo, 2016.

79 p. : fig., tab., graf. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofaciais. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida

1. Nociceptividade. 2. Articulação temporomandibular. 3. Disco da articulação temporomandibular. 4. Terapia a laser.
I. Luz, João Gualberto de Cerqueira. II. Título.

Rodrigues AF. Efeitos da laserterapia no comportamento nociceptivo e na atividade neuronal do núcleo trigeminal após lesão unilateral do disco da articulação temporomandibular, em ratos. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: 17 / 02 /2017

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). **Maria da Graça Naclério Homem**

Instituição: **FOUSP** Julgamento **APROVADO**.

Prof(a). Dr(a). **Marucia Chacur**

Instituição: **ICB-USP** Julgamento: **APROVADO**.

Prof(a). Dr(a). **Lucimar Rodrigues**

Instituição: **FUNDECTO** Julgamento: **APROVADO**.

Dedico este trabalho à minha esposa Angélica de Paula de Freitas Rodrigues, pelo apoio, pelo companheirismo, pelo carinho e pela paciência.

Dedico a minha mãe Antonia de Freitas Rodrigues, exemplo de garra e determinação.

Ao meu irmão Anderson de Freitas Rodrigues, meu grande amigo, por todo o amor e carinho.

Ao meu pai Aparecido Rodrigues (In memorian) e a minha tia Tarsila Francisca Ricardo (In memorian) pela inspiração, amor e suporte.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof.Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz, pela confiança, acolhimento e carinho ao longo desses anos. Pela amizade e orientação na realização dessa pesquisa, pela dedicação.

À Profa. Dra. Maria da Graça Naclério-Homem, por ter me dado essa oportunidade, por sua liderança e amor desde a época da graduação, pela dedicação a Pós-graduação, pela atenção no cuidado aos pacientes.

À Profa.Dra. Maria Cristina Zindel Deboni, pelo carinho, dedicação e entusiasmo, para com todos os alunos da pós-graduação.

À Profa.Dra. Marucia Chacur, pela co-orientação, por ter acreditado no trabalho e disponibilizar toda a estrutura do Laboratório de Neuromodulação da Dor no ICBII-USP, indispensáveis na realização deste trabalho.

Aos Professores do Departamento de Cirurgia e Traumatologia da FOUSP, Prof.Dr. Oswaldo Crivello Junior, Prof.Dr. José Benedito Dias Lemos, Prof.Dr. Francisco Antonio S.Correa, Prof.Dr. Antonio Silva F. Procópio, Profa.Dra. Marina Palo Prado, Profa.Dra. Andreia Aparecida Traina, Prof.Dr. Antonio Carlos de Campos, Prof.Dr. Marcos Vianna Gayotto, Prof.Dr. Reinaldo Brito e Dias, pela inspiração e carinho ao longo desses anos.

Ao Dr. Daniel de Oliveira Martins, pela amizade, pelo carinho, por compartilhar comigo os momentos mais difíceis na realização desse trabalho.

Aos amigos da pós-graduação: Rubens Camino Junior, Mariana Aparecida Brozowski, Marcelo Manzi, Vitor Rodrigues, Ricardo D'avila, Milton Saavedra, Daniel Falbo, Daniel Sendyk, Ana Paula Barbosa Lima, Yuri Slusarenko, Natacha Oliveira e Natalia Tartarotti pela ajuda e companhia durante esta etapa e pela frutífera convivência durante toda esta jornada.

Aos funcionários Maria Aparecida Conceição e Edison Vicente, em nome do qual eu agradeço a todos os funcionários da FOU SP e do ICBIII pela ajuda, colaboração e carinho.

Ao Dr. José Lineu Pereira Ogoshi, pela inspiração, pela amizade, por todo o carinho ao longo desses anos.

Aos meus amigos e familiares, que fazem parte dessa história e que me deram todo o apoio e suporte para poder realizar esse sonho.

À Primeira Igreja Presbiteriana de São Paulo, Fundação Mary Harriet Speers, Rev. Abival Pires da Silveira, por todo o amor e suporte ao longo dessa trajetória.

"Como tudo no todo em ordem se equilibra, na harmonia da vida em que palpita e vibra! As forças celestiais se exalçam e se amesquinham, e no cadinho d' ouro se acumulam e se aninham! Vaporoso vibrar sonoro e permanente, a terra toda envolve e encobre lentamente, e tudo em harmonia no todo está presente!"

Goethe

RESUMO

Rodrigues AF. Efeitos da laserterapia no comportamento nociceptivo e na atividade neuronal do núcleo trigeminal após lesão unilateral do disco da articulação temporomandibular, em ratos [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2016. Versão Corrigida.

A proposta deste trabalho foi analisar os efeitos da laserterapia de baixa potência (LLLT) no comportamento nociceptivo e na atividade neuronal do núcleo trigeminal após lesão unilateral do disco da articulação temporomandibular (ATM) em ratos. Foram utilizados 40 ratos. Foi realizado acesso cirúrgico na ATM sob anestesia geral. Os animais foram divididos em 4 grupos (n=10): Grupo 1: Lesão cirúrgica do disco articular e LLLT; Grupo 2: Sham - operado e LLLT; Grupo 3: Lesão cirúrgica do disco articular; Grupo 4, Naive: controle sem lesão articular ou LLLT. Foram realizadas 10 sessões de LLLT com laser de GaAs com comprimento de onda de 904 nm e densidade de energia 6J/cm². O desenvolvimento de sintomas neuropáticos foi avaliado pelo teste de Von Frey. As amostras do gânglio trigêmeo foram preparadas para determinação da expressão proteica da substância P (SP), do receptor de potencial transiente vaniloide do subtipo-1 (TRPV-1) e do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP). Análise estatística foi realizada (p<0,050). Houve reversão total do limiar nociceptivo, a partir da primeira sessão no grupo 1, e a partir da segunda sessão no grupo 2, e se manteve até a décima sessão. Houve um aumento da expressão de SP, TRPV-1 e CGRP no gânglio trigeminal no grupo 3 e uma diminuição significativa após a LLLT no grupo 1. Foi concluído que o uso da laserterapia tem efetividade para diminuição do comportamento nociceptivo, e que seu uso nesse modelo de lesão experimental se mostrou viável para estudo experimental das disfunções temporomandibulares.

Palavras-chave: Nocicepção. Articulação Temporomandibular. Disco da articulação temporomandibular. Terapia de Laser de baixa intensidade.

ABSTRACT

Rodrigues AF. Effects of Laser therapy in nociceptive behavior and neuronal activity in trigeminal nucleus after unilateral lesion in the disc of temporomandibular joint in rats. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2016. Versão Corrigida.

The purpose of this study was to analyze the effects of low level laser therapy (LLLT) on nociceptive behavior and trigeminal nucleus neuronal activity after unilateral temporomandibular joint (TMJ) disc injury in rats. 40 rats were used. Surgical access to TMJ under general anesthesia was performed. The animals were divided into 4 groups (n = 10): Group 1: Surgical lesion of the articular disc and LLLT; Group 2: sham operated and LLLT; Group 3: Surgical lesion of the articular disc; Group 4, Naive: control without joint injury or LLLT. Ten sessions of LLLT were performed with GaAs laser with wavelength of 904 nm and energy density 6J / cm². The development of neuropathic symptoms was evaluated by the von Frey test. The trigeminal ganglion samples were prepared for determination of the protein expression of substance P (SP), vanilloid transient potential receptor of subtype-1 (TRPV-1) and peptide related to the calcitonin gene (CGRP). Statistical analysis was performed (p <0.050). There was a total reversal of the nociceptive threshold, from the first session in group 1, and from the second session in group 2, and remained until the tenth session. There was an increase in the expression of SP, TRPV-1 and CGRP in the trigeminal ganglion in group 3 and a significant decrease after LLLT in group 1. It was concluded that the use of laser therapy is effective in reducing nociceptive behavior, and that the use of this Model of experimental lesion proved to be feasible for the experimental study of temporomandibular disorders.

Keywords: Nociception. Temporomandibular Joint. Temporomandibular joint disc. Low level laser therapy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1 - Esquema do procedimento de lesão ao disco da ATM	41
Figura 4.2 - Ilustração do teste de estimulação tátil-filamentos de Von Frey	44
Figura 5.1 - Efeitos da aplicação da LLLT na nocicepção	49
Figura 5.2 - Efeitos da LLLT sobre a expressão de SP no GT	50
Figura 5.3 - Efeitos da LLLT sobre a expressão do TRPV-1 no GT	51
Figura 5.4 - Efeitos da LLLT sobre a expressão do CGRP no GT	52

LISTA DE QUADROS

Quadro4.1 - Principais parâmetros da LLLT.....	43
Quadro4.2 - Anticorpos utilizados nos experimentos de <i>immunoblotting</i>	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATM	Articulação Temporomandibular
LLLT	Terapia com laser de baixa intensidade
SP	Substância P
TRPV-1	Receptor do potencial transiente vanilóide- subtipo 1
CGRP	gene-relacionado ao peptídeo calcitonina
DTM	Disfunção Temporomandibular
GT	Gânglio trigeminal
CFA	Composto Adjuvante de Freund
NET	Nucleo espinal do trigêmeo
DRG	Gânglio da raiz dorsal
NK-1	Receptor neuroquinina tipo 1
VAS	Escala visual analógica de dor
GaAs	Laser arseneto de gálio

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	25
3	PROPOSIÇÃO	37
4	MATERIAL E MÉTODO	39
5	RESULTADOS.....	49
6	DISCUSSÃO	53
7	CONCLUSÕES	63
	REFERÊNCIAS.....	65
	ANEXOS	76

1 INTRODUÇÃO

Dor é uma experiência emocional e sensorial subjetiva desagradável associada à real ou potencial lesão tecidual, ou descrito em termos de tal lesão. (IASP, 1986). A dor constitui o principal motivo de procura por tratamento médico/odontológico. Cerca de 15 a 30% da população dos países industrializados sofre algum tipo de dor, o que gera problemas de ordem pessoal, social e econômico em geral (Aghabeigi, 1992). Particularmente, a dor orofacial destaca-se das outras dores somáticas devido à sua grande intensidade e frequente ocorrência, o que impede muitas vezes que um indivíduo mantenha suas atividades normais (Sarhani; Greenspan, 2005).

A dor decorrente das disfunções temporomandibulares (DTM) é comum na clínica odontológica, podendo ser na forma de mialgia ou artralgia. Neste último caso, comumente é decorrente de distúrbios do disco articular, como deslocamentos ou outras lesões, mas também pode ser decorrente do trauma. A queixa principal dos pacientes com DTM é na forma de dor, sendo dor facial, cefaléia, bem como ruídos articulares e distúrbios funcionais (Luz et al.,1997). Os sintomas das DTMs são de várias intensidades e os pacientes apresentam também vários sinais, como sensibilidade à palpação, limitação de movimento, desvio no movimento e ruídos articulares. Assim, o uso de índices permite uma quantificação confiável dos sinais e sintomas para auxiliar no diagnóstico dessas disfunções (Rodrigues et al., 2016).

As várias formas de tratamento das disfunções intra-articulares da ATM são o uso de placas interoclusais, fisioterapia, estímulos elétricos, medicamentoso, artrocenteses, artroscopias conseguem controlar os sintomas de muitos casos, porém, existem casos de difícil controle da dor e que requerem novas modalidades de tratamento. Vale lembrar que o tratamento cirúrgico tem suas indicações precisas, em especial nos deslocamentos do disco sem redução, e é utilizado em uma pequena quantidade de casos.

A laserterapia de baixa intensidade (LLLT) surge como uma nova perspectiva no controle da dor nesses casos, seja no seu uso isolado, ou como coadjuvante a outras modalidades de tratamento. A LLLT é um tratamento não invasivo, de baixo custo, e de fácil aplicação. Seus efeitos clínicos esperados são analgesia, modulação da inflamação e biomodulação da atividade celular. Este último efeito,

pode ser representado pela aceleração do processo de reparo tecidual, regeneração óssea e reestabelecimento da função neural (Freitas; Simões, 2015).

Muitos estudos demonstram a eficácia da LLLT no tratamento da dor orofacial e é sabido dos efeitos bioestimuladores que a mesma produz nos tecidos, mas pouco se sabe sobre o efeito dessa modalidade de tratamento especificamente na dor intra-articular. Desta forma torna-se importante avaliar seus efeitos no comportamento nociceptivo e na atividade neuronal, o que pode contribuir para o melhor tratamento dos pacientes com essa problemática.

Do ponto de vista experimental, a dor orofacial pode ser estudada por diferentes aspectos: mecanismos neurais, mecanismos inflamatórios dos tecidos orofaciais, anormalidades da modulação central da resposta nociceptiva trigeminal e anormalidades das vias periféricas do nervo trigêmeo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ANATOMIA

A articulação temporomandibular (ATM) além de ser uma biarticulação em um único osso possui uma grande complexidade em relação aos seus movimentos por estar diretamente relacionada com a oclusão dentária. Ela apresenta suas duas superfícies ósseas, no lado temporal, a fossa mandibular e a eminência articular e no lado mandibular, o côndilo da mandíbula, envoltas pelo espaço sinovial e banhadas pelo líquido sinovial. Ela possui duas cavidades articulares sinoviais separadas, dois compartimentos, que devem funcionar em sintonia. Entre estas existe um fino disco ovalado, o disco articular, que tem a função de coaptação entre as superfícies articulares. O disco é formado por um tecido colágeno denso sem inervação ou vascularização, nas suas zonas central e anterior. Na sua zona posterior, também denominada zona bilaminar retrodiscal, coxim retrodiscal o disco continua com a sua junção posterior que consiste em tecido conjuntivo frouxo, com longas fibras elásticas e gordura, ricamente vascularizado, innervado, e recoberto pela membrana sinovial. A cápsula fibrosa marca os limites anatômicos funcionais da articulação. Medial e lateralmente, a cápsula é suficientemente firme para estabilizar a mandíbula durante os movimentos, A cápsula medial não é tão forte como a lateral, que é reforçada pelo ligamento lateral (temporomandibular). No sentido anterior e posterior, a capsula é frouxa, o que permite o movimento mandibular. A ATM é amparada por dois ligamentos acessórios (ligamentos esfenomandibular e estilomandibular) que a protegem quando da realização de movimentos extremos. A cápsula engloba o côndilo e se insere no perióstio do colo condilar. É formada por duas camadas, uma camada fibrosa externa e uma interna de tecido sinovial. A camada sinovial produz o líquido sinovial. Ao contrário do disco, a zona bilaminar pode ser facilmente comprimida e sua estrutura modificada, tornando se imprópria para uma adequada articulação, podendo este fenômeno ocorrer quando o disco se desloca. O movimento anterior do disco é limitado pela extensão da superfície inferior da zona bilaminar. Esta se estende da banda posterior do disco para baixo na parte de trás do côndilo provocando um deslocamento do disco. O ligamento estilomandibular se estende do processo estiloide ao ângulo, a borda da mandíbula e o ligamento esfenomandibular que vai

da asa maior do osso esfenóide até a língula do ramo mandibular. A inserção posterior do disco compreende a zona bilaminar que é composta por duas porções: superior e inferior. A porção superior, também chamada de ligamento temporodiscal posterior, impede o disco de deslocar-se demais para frente durante os movimentos condilares. É composta por tecido fibroelástico; insere-se nas paredes superior e posterior da cavidade articular. A porção inferior não tem fibras elásticas e se insere na parte posterior do côndilo. Assim, o disco articular se move fisiologicamente com o côndilo. A vascularização é realizada pelos ramos terminais da carótida externa: artérias maxilar e temporal superficial que nutrem a cápsula articular, a membrana sinovial, a zona bilaminar e a periferia do disco. A inervação é feita através do V par craniano. Quanto aos receptores neurossensoriais, estes estão presentes na cápsula articular e nos ligamentos. Nos tecidos periarticulares encontram-se corpúsculos de Pacini e órgãos tendinosos de Golgi em maior quantidade do que terminações de Ruffini. Há ainda terminações nervosas livres nociceptivas. Os corpúsculos de Pacini envolvem movimentos rápidos; os órgãos tendinosos de Golgi mobilizam a posição da articulação e a direção do movimento; as terminações de Ruffini contribuem para a manutenção do tônus muscular e as terminações nervosas livres nociceptivas relacionadas com a dor (Okeson; de Leeuw, 2011).

O nervo trigêmeo, V par craniano, é responsável pela condução da maior parte das informações somestésicas da face, conjuntiva ocular, dura-máter e cavidade oral, além da inervação motora de musculatura mastigatória, innervando também a ATM através do nervo aurículo-temporal nas porções posteriores, lateral e medial da cápsula articular (Cascone et al., 1987; Mohl et al., 1989; Ogus; Toller, 1981). Há ramos articulares acessórios, proveniente dos nervos temporal profundo posterior, masseterino e às vezes, do nervo pterigoideo lateral. Os corpos celulares da maioria das fibras trigeminais sensitivas encontram-se em um gânglio, localizado em uma depressão do crânio, ventralmente à ponte e denominado gânglio trigeminal (GT) (Waite; Ashwell, 2004). O complexo trigeminal é composto por quatro núcleos: o principal, mesencefálico e espinal, que são responsáveis pelo processamento de informações somestésicas e proprioceptivas, enquanto o núcleo motor do trigêmeo é responsável pela inervação motora da musculatura mastigatória. O núcleo principal do trigêmeo recebe projeções de mecanorreceptores da face e cavidade oral, sendo considerado o análogo trigeminal dos núcleos da coluna dorsal (Usunoff et al., 1997).

O nervo trigêmeo é assim denominado por possuir três calibrosos ramos, divergentes, distribuídos tanto na superfície como em profundidade em relação à face. É um nervo misto, no qual cada divisão é classificada, conforme a estrutura e distribuição a que se relaciona (Machado, 1993; Madeira, 1997). O primeiro ramo denomina-se oftálmico (órbita); o segundo, maxilar (maxila); o último, mandibular (mandíbula).

2.2 DOR INTRA-ARTICULAR E DISCO ARTICULAR

As disfunções temporomandibulares são divididas em disfunções articulares e disfunções musculares. As disfunções articulares, podem ser divididas em disfunções com transtornos do disco articular, luxações, quadros inflamatórios, e artrites. As disfunções do disco articular representam a forma mais comum de disfunções articulares e tem como forma mais frequente o deslocamento do disco articular. Este é caracterizado por uma relação anormal do disco articular e do côndilo. A forma mais frequente deste deslocamento é no sentido ântero-medial. Este deslocamento pode ocorrer com ou sem redução. O deslocamento do disco com redução é descrito como uma alteração ou interferência abrupta da relação estrutural côndilo-disco durante a translação mandibular com a abertura e fechamento de boca. De uma posição de boca fechada, o disco temporariamente desalinhado reduz ou melhora sua relação com o côndilo quando ocorre a translação com a abertura da boca, o que produz o ruído na forma de estalo. O deslocamento do disco com redução pode ou não ser uma condição dolorosa. O deslocamento do disco sem redução é descrito como uma relação estrutural disco- côndilo alterada ou desalinhada, mantida durante a translação mandibular. Deste modo, o disco não é reduzido. Deslocado, permanentemente, não melhora sua relação com o côndilo em translação. A dor está presente, especialmente relacionada a tentativa de abertura da boca. Como critério diagnóstico, além da dor precipitada pela abertura da boca, ocorre dor à palpação articular (Okeson; de Leeuw, 2011).

Disfunção temporomandibular (DTM) é um conjunto de anormalidades responsáveis por dores crônicas do tipo recorrente, não progressivas e associadas a um impacto leve, ou moderado, na atividade social do paciente (Von Korff et al., 1995). A dor da DTM é músculo-esquelética, ou seja, de origem muscular, articular

ou mista. A designação de DTM é genérica e designa vários subgrupos de dores musculoesqueléticas relacionadas à atividade mandibular, portanto engloba as condições dolorosas crônicas decorrentes dos músculos mastigatórios, das articulações temporomandibulares e das estruturas associadas (Mcneill, 1995). Na epidemiologia, dentro das síndromes álgicas que atingem os segmentos cefálico e cervical (IASP, 1986), seguramente os pacientes com dor crônica por DTM compõem um grupo expressivo do ponto de vista clínico, social e econômico (De kanter et al., 1993). A etiologia é considerada multifatorial (Fricton, 1991) e não está totalmente compreendida devido à complexidade morfofuncional do próprio aparelho mastigatório e pela dificuldade de se estabelecer modelos experimentais de dor que reproduzem as variáveis observadas na clínica (Svensson et al., 1995). Em uma revisão sistemática (Tanaka et al., 2008) abordou sobre a complexidade dos fatores etiológicos relacionados a ATM envolvendo a biomecânica e bioquímica, associados à sobrecarga funcional da articulação através de achados clínicos, radiográficos e bioquímicos. Ali e Sharawy. (1994) investigando as alterações histopatológicas que ocorrem na ATM de coelhos após deslocamento anterior do disco sem redução observou alterações no disco articular, na zona bilaminar, no osso subcondral, na cartilagem condilar, na eminência articular e na membrana sinovial e estas alterações eram caracterizadas por degeneração, formação microcística, hiper celularidade, hiperplasia cartilaginosa, ossificação, agregação de celular inflamatórias e incremento de fibrilas. Em um estudo clínico, randomizado para avaliação de tratamentos não cirúrgicos de deslocamento anterior de disco da ATM(Minakuchi et al., 2001), observou a efetividade de 3 modalidades, medicamentoso, com dispositivo interoclusal, e fisioterápico no alívio da dor de pacientes com deslocamento de disco anterior previamente detectados por ressonância magnética e concluiu que nenhuma diferença significativa foi evidente para os tratamentos testados e a condição de controle. Em seu estudo dos mecanismos centrais da dor orofacial (Merril, 2007) nos mostrou uma interessante exposição sobre a ciência básica da dor envolvida, mas com uma expansão da perspectiva no contexto da dor orofacial, de forma a desenvolver uma maior compreensão na patofisiologia da dor que é relatada nas disfunções temporomandibulares.

2.3 O MODELO DA LESÃO DO DISCO ARTICULAR DA ATM

As lesões do disco da ATM ou distúrbios intra-articulares ou desarranjos internos, representam uma relação anormal do disco articular com a cabeça da mandíbula. Geralmente ocorre deslocamento anterior e medial do disco, sendo menos frequentes as perfurações do mesmo. Os fatores que contribuem para o surgimento possuem diferentes tipos de origem como o stress mecânico (Fujisawa et al., 2003) gerado por desequilíbrio postural, muscular ou oclusal, o trauma, as doenças degenerativas como a osteoartrite, as patologias maxilofaciais e as infecções. Do ponto de vista experimental, a dor orofacial é estudada por diferentes aspectos: mecanismos neurais, mecanismos nos tecidos inflamatórios, anormalidades da modulação central da resposta nociceptiva trigeminal e anormalidades das vias periféricas do nervo trigêmeo (Gregory et al., 2013). Para tanto, diversos modelos têm sido utilizados, representados: como a injeção de substâncias flogísticas como formalina (Goulart et al., 2005; Barretto et al., 2013), carragenina (Goulart et al., 2005; Carvalho et al., 2011; Barretto et al., 2013), composto adjuvante de Freund (CFA) utilizado como modelo de dor inflamatória (Chacur et al., 2009) ou na própria articulação (Hutchins et al., 2000; Kramer et al., 2010; Lemos et al., 2016) ou, ainda, óleo de mostarda (Bonjardim et al., 2009). Também o uso de métodos físicos têm sido descritos, como o forçamento do deslocamento do disco através de abertura excessiva da boca em coelhos (Fujisawa et al., 2003), discectomia para alteração das circunstâncias mecânicas no espaço intracapsular em coelhos (Takatsuka et al., 1996) ou em macacos (Bjørnland et al., 1999) e perfuração do disco articular em coelhos (Axelsson et al., 1992; Sato et al., 1998). Ao analisar o crescimento mandibular relacionado com lesão unilateral do disco da articulação temporomandibular através de esmagamento por 10 segundos do disco da articulação temporomandibular com pinça halstead no sentido anteroposterior em ratos, Toledo et al. (2014) verificaram uma relação estatística significativa entre déficit de crescimento mandibular e presença de lesão no disco da ATM.

2.4 TRANSMISSÃO NOCICEPTIVA DA REGIÃO OROFACIAL

O sistema trigeminal, com os neurônios de primeira ordem no gânglio trigêmeo (TG), transmite informação sensorial da maioria dos tecidos craniofaciais, incluindo as meninges, articulação temporomandibular e dentes (Shankland, 2000). Várias condições comuns de dor crônica, enxaquecas, dores de cabeça recorrentes, disfunções temporomandibulares e neuralgias do trigêmeo são mediadas por vias nociceptivas trigeminais (Pietrobon; Striessnig, 2003; Prasad; Galetta, 2009). Fibras sensoriais primárias que inervam a região orofacial derivam de neurônios do GT, no qual os processos centrais entram na ponte, onde eles descem no tronco cerebral como o tracto trigeminal espinal (Lazarov, 2000; 2002). Existem dois tipos principais de fibras aferentes do trigêmeo: de pequeno diâmetro, condução lenta, fibras mielinizadas A- delta e fibras C não mielinizadas. Os neurônios do gânglio trigeminal são do tipo pseudo-unipolar (Lazarov, 2002). Uma variedade de peptídeos associados à nocicepção são conhecidos por estar presentes nas fibras que incluem peptídeo relacionado com o gene da calcitonina (CGRP), substância P, somatostatina, galanina e encefalinas. O núcleo espinal do trigêmeo (NET) é o local onde se encontram neurônios nociceptivos de segunda ordem do trigêmeo, e é dividido em três subnúcleos de caudal para rostral: caudalis (Vc), interpolaris (Vi), e oralis (Vo) (Sessle, 2000). O principal neurotransmissor no NET é o glutamato e outros agentes, tais como a substância P, ácido γ -aminobutírico e encefalina também estão presentes, que modulam a sinalização e processamento da informação sensorial orofacial em nível central (Fan et al., 2011). A partir da porção sensitiva do complexo trigeminal, as sensações algícas, térmicas e proprioceptivas são veiculadas através de vias neurais específicas até o tálamo, de modo análogo ao que ocorre com as informações sensoriais, captadas em outros tecidos periféricos e transmitidas a partir da medula espinal (Waite; Ashweel, 2004).

2.5 MEDIADORES QUIMICOS DA DOR

Lesão tecidual pode desencadear um quadro de hiperalgesia, causado pela redução do limiar nociceptivo e pelo aumento da excitabilidade dos aferentes primários. Isto ocorre por que a lesão tecidual promove a liberação de diferentes substâncias e a ativação de receptores que contribuem o quadro de sensibilização. O receptor de potencial transiente vanilóide do subtipo 1 (TRPV-1) é altamente expresso em neurônios sensoriais primários de pequeno diâmetro no gânglio da raiz dorsal (DRG) e gânglio do trigêmeo (GT) (Tominaga, 2010). TRPV-1 é relatado por estar envolvido em quadros de inflamação (Amaya et al., 2003), e dor neuropática (Hudson, 2001; Rashid et al., 2003; Fukuoka et al., 2002). Na dor orofacial, TRPV-1 é relatado por estar envolvido na inflamação da polpa dentária (Chidiac, 2002; Tarsa, 2010), disfunção temporomandibular (DTM) (Ro et al., 2009), câncer bucal (Nagamine et al., 2006) e dor relacionada a lesão do nervo alveolar inferior (Kim et al., 2008). Estudos também revelaram que a administração de antagonistas do TRPV-1, apresentam efeitos analgésicos tanto na dor inflamatória quanto neuropática (Caterina et al., 2000; Davis et al., 2000; Garcia Martinez et al., 2002; Walker et al., 2003; Pomonis et al., 2003). Estudos tem relatado o papel do TRPV-1 não somente como um sensor classicamente associado à transdução de estímulos térmicos potencialmente prejudiciais, que são percebidos como dolorosos, uma vez que é essencial para o desenvolvimento da hipersensibilidade térmica durante a inflamação, mas também tem sido implicada sua participação no desenvolvimento da dor inflamatória bem como mudanças na sua expressão após a lesão de nervos periféricos (Luo et al., 2004; Obata et al., 2004; Kanai et al., 2005; Breese et al., 2005). Uma vez que, estudos têm demonstrado que certas lesões e doenças inflamatórias induzem a um aumento na expressão de receptores TRPV1 na medula espinal, fato que colabora para a sensibilização dos neurônios aferentes primários, contribuindo com casos de alodinia ou hiperalgesia (Hudson et al., 2001; Luo et al., 2004). Outro fator que pode levar à sensibilização do receptor TRPV-1 e consequente geração de estados hiperalgésicos é a via de interação com receptores NK-1 para a substância P (SP) (Lin et al., 2007). Sendo que, estudos de imuno- histoquímica ja demonstram que a SP e receptor NK-1 são localizados com TRPV-1 em neurônios do gânglio da raiz dorsal ou do trigêmeo (Bae, 2004; Zhang et al., 2007). Um estudo com biopsias de ATM de pacientes com dor articular e

controles assintomáticos mostrou a presença do TRPV-1 em ambos os grupos, sugerindo que essa substância tem um papel fisiológico na ATM (Sato et al., 2005). A participação da SP no processo nociceptivo advém de estudos em animais, os quais mostraram quantidades alteradas de SP no tecido lesado (Sahbaie et al., 2009). Substância P é encontrada em altas concentrações nas terminações aferentes da medula espinal, sendo o mediador da primeira sinapse da dor. Estudos têm mostrado que a administração de SP produziu, em animais, comportamentos como de coçar, morder e lambrer, indicando nocicepção, e sugerindo que a SP possa ter papel estimulatório importante na via nociceptiva.

A substância P (SP) é um neuropeptídeo composto por uma cadeia de 11 resíduos de aminoácidos que atua como neuromodulador. A substância P facilita processos inflamatórios, vômito, ansiedade e nocicepção. Pode ser encontrada tanto no sistema nervoso central, como no periférico. Ela é secretada pelos nervos sensitivos específicos e células com função fagocitária como macrófagos, eosinófilos, linfócitos e células dendríticas e atua ligando-se ao receptor da neuroquinina-1 NK-1 (Satake et al., 1998), é degradada por endopeptidases neutras. A SP dependendo do receptor, desempenha as seguintes funções: resposta de dor na medula espinhal, regulação da resposta emética, regeneração de tecido epitelial, regeneração de tecido nervoso. Ela aumenta a atividade do glutamato no sistema nervoso central, estando associada com o desenvolvimento de edema cerebral e déficits funcionais após lesão cerebral traumática. Além disso, a estimulação das fibras aferentes periféricas resultou na liberação de SP dentro do gânglio trigeminal, e essa liberação é aumentada após inflamação orofacial (Neubert et al., 2000). Estes dados sugerem que a SP periférica desempenha um papel no processo nociceptivo trigeminal (Bowles et al., 2003; Caviedes-Bucheli et al., 2006; Awawdeh et al., 2002). No entanto, considerando a dor orofacial, poucos estudos têm demonstrado o envolvimento do sistema periférico SP/NK-1 em hiperalgesia inflamatória e alodinia experimental (Takeda et al., 2005; Denadai-Souza et al., 2009). Em um estudo com pacientes com disfunções temporomandibulares e um grupo controle, a análise do líquido sinovial mostrou maior nível de SP no grupo de pacientes com disfunções, em especial com alterações degenerativas (Li et al., 2015).

Outro componente importante no processamento nociceptivo é o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP). O CGRP é amplamente expresso no

trajeto da dor trigeminal, tanto a nível periférico quanto central (Hansen; Ashima, 2014). Em um estudo experimental, demonstrado que a aplicação de CGRP, produz uma excitação lenta e prolongada em neurônios no corno dorsal, que evidencia que o CGRP tem um efeito sobre a atividade excitatória neuronal, o que implica que o CGRP pode promover a transmissão da informação nociceptiva no corno dorsal da medula espinal (Bird et al., 2006; Sun et al., 2004; Yu et al., 2002). Sendo que o CGRP pode facilitar a nocicepção por retardar o metabolismo da SP e, também, por aumentar a liberação de SP e de glutamato nas terminações centrais das fibras aferentes primárias (Oliveira et al., 2010). Em um estudo com pacientes com dor em disfunções temporomandibulares, foi coletado tecido sinovial e análise imunohistoquímica mostrou um aumento da expressão do CGRP no grupo disfunção, sugerindo um papel desse peptídeo na produção da dor (Sato et al., 2004).

2.6 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO NOCICEPTIVO

Diferentes estímulos são necessários para avaliar a integridade das fibras aferentes e compreender melhor esses mecanismos envolvidos em diferentes condições dolorosas que podem afetar a região orofacial. O conjunto dos testes quantitativos sensoriais (TQS) consiste em um instrumento de avaliação de sinais sensoriais positivos e negativos que ajudam a identificar os mecanismos neurais e as alterações somatossensoriais por baixo das diferentes condições patológicas que envolvem o mecanismo de dor, facilitando o diagnóstico e guiando a opção de tratamento. Pode-se caracterizar uma dor inflamatória, ou neuropática, aguda ou crônica, com envolvimento mais periférico ou central. Teste de sensibilidade tátil com monofilamentos. Os monofilamentos adaptados por Semmes-Weinstein são utilizados para determinação do limiar tátil. O kit utilizado contém monofilamentos de náilon de diferentes diâmetros calibrados para exercer forças específicas que aumentam conforme também aumenta o calibre do monofilamento. Cada monofilamento é aplicado perpendicularmente à região a ser avaliada e uma leve pressão é aplicada até o filamento curvar-se.

Outros testes podem ser utilizados como o Limiar de dor à pressão (LDP), que é realizado através da utilização de um algômetro da marca Kratos®, contendo uma extremidade circular, chata, com 1cm² de área que é utilizada para aplicar

pressão no músculo desejado (Sydney; Conti, 2011). Outros testes são utilizados para a avaliação do fenômeno doloroso na região orofacial; como os que mensuram o comportamento nociceptivo através da contagem de movimentos de esfregaços com a pata dianteira ou traseira ipsilateral na região operada (assimétrica) e os movimentos de balanceio da cabeça, no período de recuperação pós-anestésica por 45 minutos (Levin et al., 1978; Jacobs et al., 2002; Sidney; Conti, 2011; Barretto et al., 2013; Desiderá et al., 2015).

2.7 LASERTERAPIA

A palavra Laser tem seu significado a partir de Light amplification by stimulated emission of radiation. Constitui uma forma de radiação não ionizante, altamente concentrada. O resultado terapêutico depende do tecido irradiado e do tipo de laser utilizado (Nascimento, 2001).

A terapia por laser de baixa potência tem sido utilizada na Medicina e Odontologia nos últimos anos e, quando bem indicada, apresenta ótimos resultados. O laser de baixa potência tem demonstrado eficiência devido à resposta que produz nos diversos tecidos, como redução do edema, controle do processo inflamatório, aumento da fagocitose, da síntese de colágeno e da epitelização. A exposição de um corpo à radiação laser em baixa intensidade, com uma densidade de potência de alguns mW / cm^2 , minimiza a possibilidade da manifestação de efeitos térmicos, já que a intensidade utilizada é baixa o bastante para que a temperatura não ultrapasse $37,5^\circ\text{C}$ (Ribeiro, 2004).

Os efeitos não térmicos produzidos pela radiação de baixa potência são amplamente discutidos, pois de certo modo não são conhecidos todos os mecanismos nem todos os elementos que participam da conversão de energia luminosa em energia bioquímica, capaz de gerar analgesia ou regeneração. Segundo alguns autores, os mecanismos que envolvem o processo de bioestimulação ocorrem em nível molecular. Neste caso, a luz laser penetra no interior do tecido onde é absorvido por determinados cromóforos, resultando no aumento do metabolismo celular através do aumento da síntese de ATP pelas mitocôndrias (Karu, 1999).

O laser de baixa potência promove efeitos semelhantes de modulação da inflamação e analgesia do que a medicação anti-inflamatória não esteroide, além de

estimular a microcirculação local e a proliferação celular, favorecendo ainda mais os eventos de reparação no pós-operatório (Rochkind et al., 2001; Shamir et al., 2001). A terapia de laser de baixa potência também possui efeitos terapêuticos como, por exemplo, a aceleração de cicatrização (Amorim et al., 2006; Gal et al., 2009), redução da sintomatologia dolorosa (Albrektsson; Hansson, 1986), restauração da função neural após o dano, aprimoramento da remodelação e reparo ósseo, normalização da função hormonal, estímulo de liberação de endorfina e modulação do sistema imune (Miloro et al., 2002; Rochkind et al., 2007). Em uma meta análise dos efeitos clínicos da laserterapia na dor da ATM (Chang et al., 2014), observou que o uso do LLLT na ATM promoveu um efeito analgésico moderado e que os parâmetros ótimos de LLLT no tratamento da dor não são confirmados. Em um ensaio clínico duplo-cego com 20 pacientes com osteoartrite na ATM que foram divididos aleatoriamente em grupos com laser de baixa intensidade e com placebo, (Madani et al., 2014) observou não haver diferença significativa nos sintomas de dor dos músculos mastigatórios e ATM entre os grupos de laser e placebo ($P > 0,05$), mas houve algumas melhorias significativas dentro do grupo para os escores da Escala Visual Analógica (VAS) do corpo do masseter e ATM em ambos os grupos.

Em um estudo clínico para avaliar a eficácia da LLLT no tratamento de DTM em relação à intensidade da dor, pontos sensitivos, sons articulares e movimentos mandibulares em 20 pacientes que receberam 6 sessões de LLLT (3 vezes por semana durante 2 semanas) com laser de diodo semicondutor (arseneto de gálio, 904 nm, 0,6 W, 60 s, 4 J / cm²), aonde a intensidade da dor, o número de pontos sensíveis, os sons das articulações e a amplitude de movimento ativa foram avaliados antes e imediatamente após cada sessão e após 1, 2 semanas, 1, 3 e 6 meses (Sayed et al., 2014) observou que a LLLT promoveu resultados satisfatórios na redução da intensidade da dor, número de pontos dolorosos, sons articulares e melhora na amplitude do movimento mandibular.

Em um estudo clínico duplo cego para avaliar a eficácia do protocolo com LLLT vermelho e infravermelho com parâmetros de 660nm 4 J / cm² nas articulações temporomandibulares com parâmetros e 796 nm 8 J / cm² nos músculos em três sessões (Pereira et al., 2014) observou que ambos os tratamentos apresentaram resultados estatisticamente significativos ($P, 0,001$), havendo melhora em 24 horas, que se estenderam até 180 dias em ambos os grupos, concluindo que ambos os lasers são eficazes no tratamento e remissão de sintomas de DTM.

Em um estudo de revisão de literatura (Jenkins; Carroll, 2011) estabeleceu os 8 critérios a serem observados nos parâmetros da LLLT tanto em estudos experimentais e clínicos, que são: comprimento de onda, potência, tempo de irradiação, área de feixe na pele ou superfície de cultura (isto não é o mesmo que o tamanho de abertura), parâmetros de pulso, localização anatômica, número de tratamentos e intervalo entre tratamentos. Os três parâmetros de dose comumente usados são tempo, energia e densidade de energia.

Em um estudo experimental para avaliar os efeitos da laserterapia no comportamento nociceptivo após lesão do nervo alveolar inferior e o possível envolvimento das neurotrofinas, (de Oliveira Martins et al., 2013) observou que os animais feridos tratados com laser apresentaram um comportamento nociceptivo melhorado. Nos animais irradiados, houve uma expressão aumentada de NGF (53%) e uma expressão de BDNF diminuída (40%) após a terapia a laser.

Em um estudo *in vitro* para analisar os efeitos irradiação de LLLT na proliferação celular (Moore et al., 2005) observou que os fibroblastos proliferaram mais rapidamente do que as células endoteliais em resposta à irradiação com laser

Em um estudo experimental para análise dos efeitos da laserterapia na expressão dos fatores mPGES-1 e IP mRNA na região subplantar e nos tecidos cerebrais após indução de inflamação na região subplantar por carragenina (Chagas et al., 2015), observou haver uma diminuição na expressão desses fatores após a aplicação do protocolo de laserterapia.

3 PROPOSIÇÃO

A proposta deste trabalho foi analisar os efeitos da laserterapia no comportamento nociceptivo e na atividade neuronal do núcleo trigeminal após lesão unilateral do disco da articulação temporomandibular (ATM) em ratos.

4 MATERIAL E MÉTODO

O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo sob o protocolo nº 006/2015 (Anexo A). Também, este projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo sob o protocolo nº 037, fls.31 do livro 03, em 30/03/2015, com validade de 4 anos, estando de acordo com os princípios éticos de experimentação animal estabelecidos pela Sociedade Brasileira de Ciências de Animais de Laboratório (SBCAL) e pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) (Anexo B).

Foram utilizados 40 ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, com dois meses de idade e com média de 160 gramas de peso corporal. Os animais permaneceram em gaiolas coletivas (cinco por gaiola) em ambiente com temperatura constante de $23^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e sob ciclo de iluminação (claro/escuro) de 12/12 horas (acendimento das luzes artificiais às 7h), tendo livre acesso à água e dieta padrão composta por ração comercial. Os procedimentos foram realizados no Laboratório de Neuroanatomia Funcional da Dor, no Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas III da Universidade de São Paulo..

4.1 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

A indução anestésica foi realizada com o emprego de cloridrato de quetamina 10% (Cetamin®, Rhobifarma Indústria Farmacêutica Ltda., Hortolândia, SP, Brasil) na dose de 25mg/kg de peso corpóreo e cloridrato de xilazina 2% (Xilazin®, Rhobifarma Indústria Farmacêutica Ltda., Hortolândia, SP, Brasil) na dose de 10mg/kg de peso

corpóreo, administradas por via intraperitoneal. Foi realizada tricotomia do lado direito da face na região da articulação temporomandibular, e antissepsia com solução tópica de polivinilpirrolidona-iodo a 10%. O campo operatório foi isolado com a aposição de campos esterilizados descartáveis. O operador esteve devidamente paramentado para o procedimento.

Os animais foram submetidos à acesso cirúrgico na região pré-auricular do lado direito. Foi realizada uma incisão da pele de 1 cm na região pré-auricular, tendo como referência o arco zigomático, utilizando lâmina de bisturi nº 15, montada em cabo nº 3, seguida da incisão do plano muscular e divulsão dos tecidos subjacentes, que foram mantidos afastados, (Toledo et al., 2014) e:

Divisão dos grupos experimentais: Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais, com 10 animais cada (n=10), da seguinte maneira:

1. Grupo lesão e aplicação de laser pós (Op+L): incisão da cápsula e visualização do disco articular, lesão do disco articular com emprego de pinça mosquito (Halstead) comprimindo-o no sentido ântero-posterior por 10 s (Toledo et al., 2014) com a aplicação de laser no pós-cirúrgico.

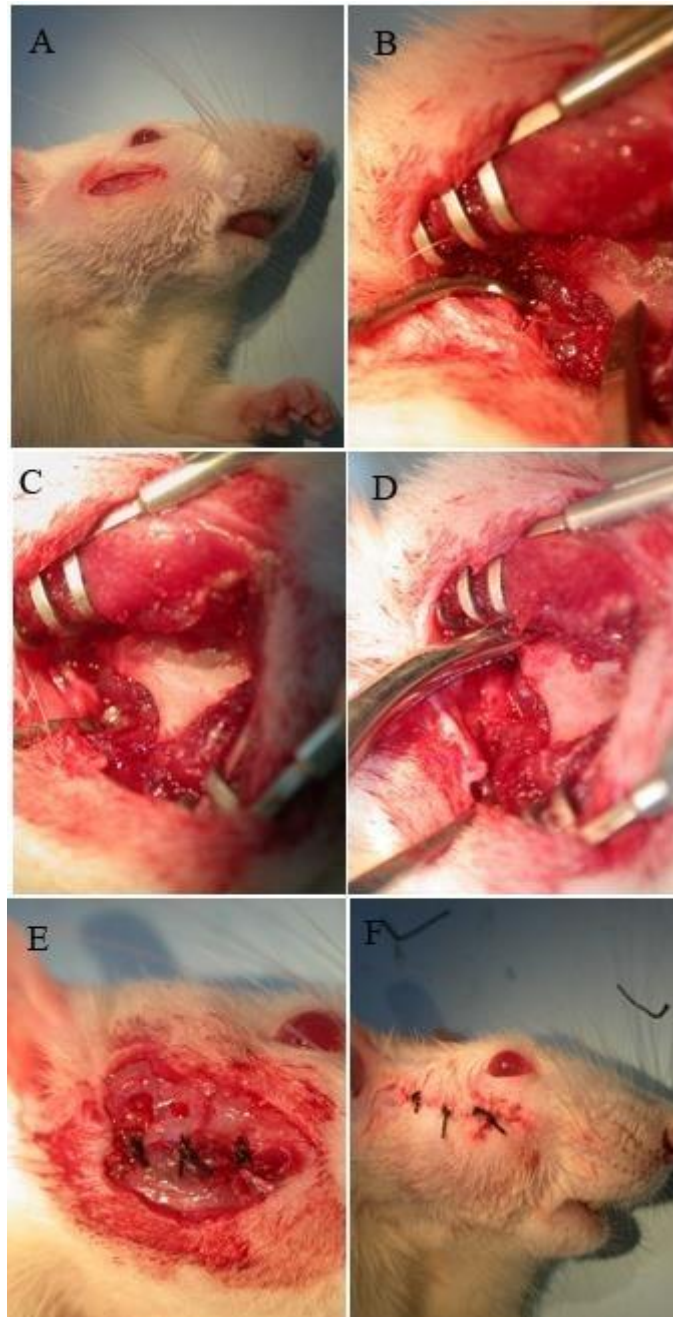
2. Grupo Falso operado e laser (Fop+L): Controle submetido à laserterapia. Tendo sido feito apenas o acesso cirúrgico, visando diminuir o viés.

3. Grupo lesão (Op): Lesão no disco articular com emprego de pinça mosquito (Halstead) no sentido ântero-posterior.

4. Grupo Controle (Naive): Sem lesão articular ou laser.

Os planos teciduais muscular e superficial foram suturados em posição utilizando fio de sutura de seda 4-0 (Ethicon®, Johnson&Johnson, São Paulo, SP, Brasil). Após a intervenção cirúrgica, os animais foram alojados em gaiolas adequadas, e observados até o momento em que despertaram, sem do então levados novamente ao biotério.

Figura 4.1 - Esquema do procedimento de lesão ao disco da articulação temporomandibular. Em (A) temos o trajeto da incisão realizada, em (B) vemos o musculo masseter após separação das bordas da incisão e em (C) vemos a articulação temporomandibular após acesso e em (D) vemos o pinçamento o do disco utilizando uma pinça hemostática curva, segundo dente da cremalheira, em € vemos a sutura do plano muscular em (F) vemos a sutura da pele



Laboratório de neuroanatomia funcional da dor. Departamento de Anatomia. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP).

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E APLICAÇÃO DO LASER PÓS-LESÃO

Os animais foram divididos inicialmente em quatro grupos, sendo que dois grupos (Op+L, Fop+L) foram irradiados com laser de GaAs (Arseneto de Gálio, Laserpulse-Laser Ibramed) emitindo um comprimento de onda de 904 nm, potência de saída de 70Wpk, com uma área de saída por ponto de cerca de 0,1 cm², com frequência de 9500 Hz, tempo de pulso de 60 ns e uma densidade de energia de 6J/cm² (Todos os parâmetros do laser utilizado neste estudo encontram-se no quadro 4.1) e os outros dois (Op, Naive) não sofreram aplicação do laser.

O tratamento com o laser foi realizado a cada dois dias, totalizando 10 sessões. Os animais foram irradiados com 6 J/cm², durante 18s por ponto (de Oliveira Martins et al., 2013). Foi irradiado um ponto sobre a articulação temporomandibular e mais quatro pontos, sendo um superior, um anterior, um inferior e um posterior a esta articulação. Após a 10^a sessão, os animais foram eutanaziados, cujos métodos serão descritos a seguir, para obtenção de material que será analisado por immunoblotting.

Quadro4.1-Principais parâmetros do laser como parâmetros sobre feixe de luz, dose utilizada e técnica de aplicação

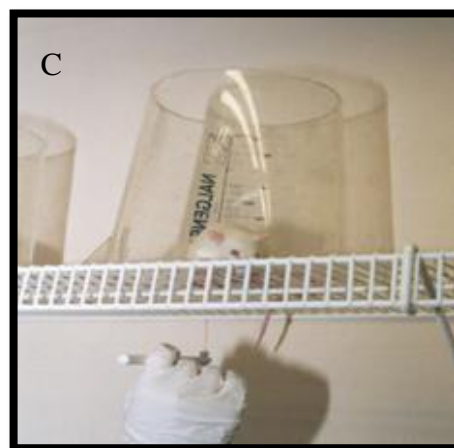
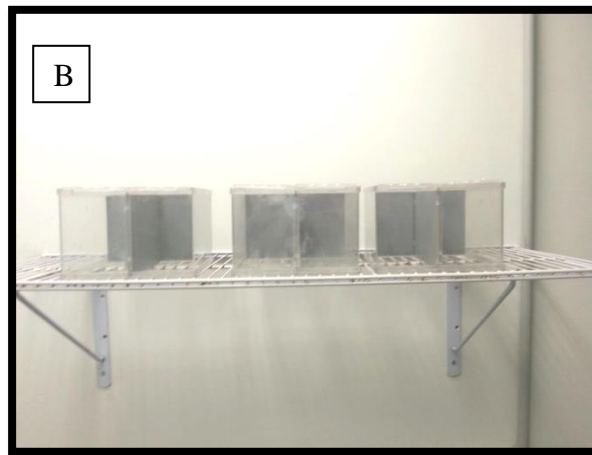
INFORMAÇÕES DO APARELHO	
Fabricante	IBRAMED
Identificação do modelo	LASERPULSE Diamond
Tipo emissor	GaAs
PARÂMETROS DE IRRADIAÇÃO	
Comprimento de onda [nm]	904 nm
Mode de operação	Pulsado
Frequencia [Hz]	9500 Hz
Duração do pulso [sec]	60 ns
Forma do feixe	Circular
PARAMETROS PARA O TRATAMENTO	
Tamanho do feixe no ponto alvo [cm ²]	0.1 cm ²
Tempo de exposição [sec]	18s
Exposição radiante [J/cm ²]	6J/cm ²
Energia radiante [J]	6J
Número de pontos irradiados	5
Area irradiada [cm ²]	0.5 cm ²
Tecnica de aplicação	Sem contato com a pele
Número e frequência de sessões do tratamento	10 sessões, realizadas a cada dois dias
Energia radiante total [J]	30J por sessão, 300J ao total das sessões

Fonte: de Oliveira Martins et al.(2013)

4.3 EXPERIMENTO DE NOCICEPÇÃO

O desenvolvimento de sintomas neuropáticos em volta da ATM na área operada foi avaliado pelo teste de allodynia (Von Frey test), em resposta ao estímulo tátil aplicado ao redor da pele da ATM atingida de acordo com a modificação do teste realizada por Chaplan et al.(1994) figura 4.2. Esse procedimento foi realizado antes do ato operatório bem como 2 dias após a cirurgia, testando cegamente e com consideração a designação do grupo resumido, a serie logarítmica de 5 monofilamentos calibrados, 8 semmes-weinstein (Von Frey hair test, Stelting USA) foi usado. Cada rato foi acomodado a uma gaiola plástica individual e o Von Frey test foi aplicado na superfície da pele em volta da ATM por no máximo 10 segundos.

Figura 4.3—Ilustração do teste de estimulação tátil – Filamentos de Von Frey



Laboratório de neuroanatomia funcional da dor. Departamento de Anatomia.
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP).
a kit de filamentos de Von Frey, b caixa acrílica para contenção do animal, c aplicação dos filamentos no animal

4.4 ANTICORPOS UTILIZADOS

A relação de anticorpos que foram utilizados encontra-se no Quadro 4.2. Todos os anticorpos relacionados têm sido rotineiramente testados no laboratório em que foi feito o trabalho e estão disponíveis comercialmente.

4.5 IMMUNOBLOTTING

Cabe mencionar que inicialmente, os animais foram utilizados nos testes comportamentais e após seu término, os mesmos foram eutanaziados (utilizando guilhotina). As amostras do gânglio do trigêmeo foram coletadas rapidamente, representadas por um pool de 2 animais cada, e homogeneizadas em sonicador em tampão de extração (100 mM de Tris pH 7,4, 100 mM de pirofosfato de sódio, 100mM de fluoreto de sódio, 10mM de EDTA, 10 mM de ortovanadato de sódio, 2 mM de PMSF e 0,01 mg / ml de aprotinina), posteriormente foram incubadas com 1% de Triton-X 100 por 30 minutos a 4°C, e em seguida centrifugadas a 12.000 rpm a 4°C por 20 minutos para a remoção do material insolúvel. Parte do sobrenadante é utilizada para determinação do conteúdo proteico por espectrofotometria, utilizando-se o reagente para ensaio de proteína (BioRad Protein Assay-Dye Reagent Concentrate; Melville, NY), e utilizamos curva padrão de albumina como referência. O restante do sobrenadante é diluído em tampão Laemmli (azul de bromofenol 0.1%, fosfato de sódio 1 M pH 7,0, glicerol 50% e SDS 10%) contendo 200mM de DTT (ditiotreitól), em proporção de 5:1 e fervidas por 5 minutos. As amostras assim obtidas serão congeladas e mantidas a -20°C até sua utilização.

Cerca de 60 µg de proteína total foram submetidos à eletroforese em gel bifásico (gel de empilhamento e gel de resolução 8%) em aparelho para minigel de poliacrilamida (Mini-Protean®, Bio-Rad; Melville, NY), juntamente com marcador de peso molecular pré-corado disponível comercialmente (Bio-Rad; Melville, NY). A transferência das proteínas foi feita eletricamente para uma membrana de nitrocelulose (Amersham Biosciences; Piscataway, NJ), utilizando aparato para transferência semi-seca (Bio-Rad; Melville, NY) e realizada durante 2 horas a 120V em gelo, banhada com tampão de transferência.

Após a transferência, as membranas foram incubadas com solução bloqueadora constituída de 5% de leite desnatado diluído em solução basal (10 mM de Tris, 150mM de NaCl e 0,02% de Tween 20) a 4°C overnight ou à temperatura ambiente, durante 2 horas. Em seguida, as membranas foram lavadas 4 vezes durante 5 minutos com solução basal sob agitação. Posteriormente foram incubadas com o anticorpo específico da proteína pesquisada overnight, a 4°C, de acordo com o Quadro 4.2.

Após incubação, as membranas foram lavadas 3 vezes durante 10 minutos com solução basal sob agitação e incubadas, à temperatura ambiente, com anticorpos secundários anti-IgG ligados à peroxidase, por 1 hora. A seguir, as membranas foram lavadas com solução basal sob agitação e reveladas. Para revelação utilizamos o kit de quimioluminescência ECL (Amersham Biosciences; Piscataway, NJ) ou o Western Blotting Luminol Reagent (Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, CA). As soluções 1 e 2 do kit foram adicionadas na proporção 1:1, recobrando as membranas e após 1 minuto de reação as membranas serão secas em papel de filtro, ensacadas e expostas (protegidas da luz) a filme de raio-X.

A intensidade das bandas reativas formadas foi quantificada por densitometria óptica (Scion Image – Release Beta 3b, NIH, USA) e corrigida pela densidade observada para a β -actina, considerando-se as amostras dos animais controle como o padrão para a normalização dos resultados. A análise estatística para a imunorreatividade das bandas reveladas foi realizada através de análise de variância de duas vias com pós-teste de Bonferroni com o uso do software GraphPad Prism 4.00 (San Diego, CA).

4.6 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Para os ensaios de immunoblotting a intensidade das bandas reativas formadas foi quantificada por densitometria óptica (Scion Image – Release Beta 3b, NIH, USA) e corrigidas pela densidade observada para a β -actina, considerando-se as amostras dos animais controle como o padrão para a normalização dos resultados. A análise estatística para a imunorreatividade das bandas reveladas foi realizada através de análise de variância de duas vias com pós-teste de Tukey com

o uso do software GraphPad Prism 4.00 (San Diego, Ca). O índice de significância foi de $p < 0.05$ (Snedecoret al., 1946).

Quadro4.2 - Anticorpos utilizados nos experimentos de *immunoblotting* e suas respectivas concentrações

Proteína	Método	Animal de origem	<i>Immunoblotting</i>
Monoclonal anti-Substancia P (Millipore, Temecula California)		Coelho	1:1000
Policlonal anti-CGRP (ab47027 Abcam INC.)			
Monoclonal anti-TRPV1 (Chemicon, Canada)		Coelho	1:1000
Monoclonal Anti- β -Actina (Sigma – Saint Louis)		Camundongo	1:10000
HRP anti-camundongo (Amershan Biosciences – Buckinghamshire, UK)		Coelho	1:5000
HRP anti-coelho (Amershan Biosciences – Buckinghamshire, UK)		Camundongo	1:5000
HRP anti-rato (Jackson ImmunoResearch Laboratories; West Grove, PA)		Coelho	1:5000

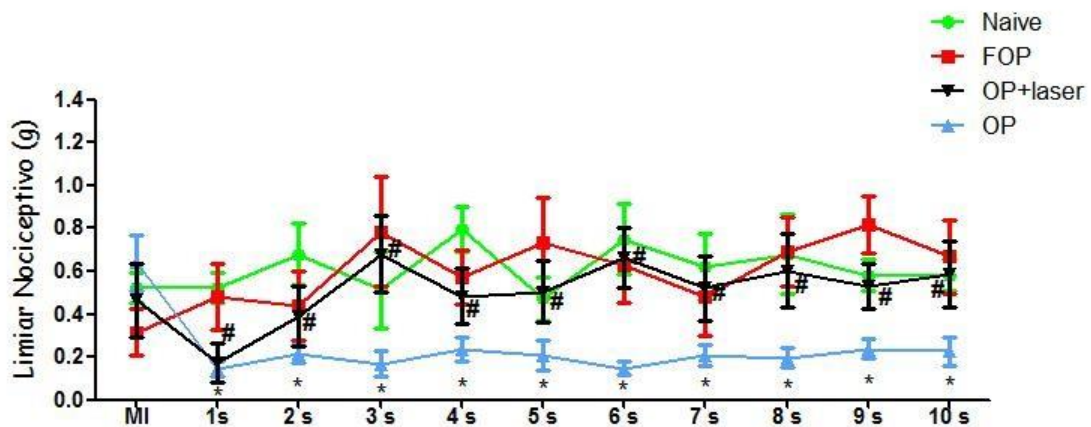
Laboratório de neuroanatomia funcional da dor. Departamento de Anatomia.
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP).

5 RESULTADOS

5.1 EFEITO NA ALODINIA TÁTIL

Neste estudo, foi observado que após a lesão do disco articular, houve diminuição do limiar de alodinia, quando comparado a medida inicial, ao naive e ao falso-operado com laserterapia e ao operado com laserterapia (figura 5.1). Foi observada reversão total do limiar nociceptivo dos animais tratados, a partir da segunda sessão no grupo operado mais laser, e que se manteve até a décima sessão analisada, não havendo alteração nos grupos controle.

Figura 5.1 – Efeito da aplicação do laser de baixa intensidade sobre a resposta nociceptiva nos ratos com lesão do disco articular



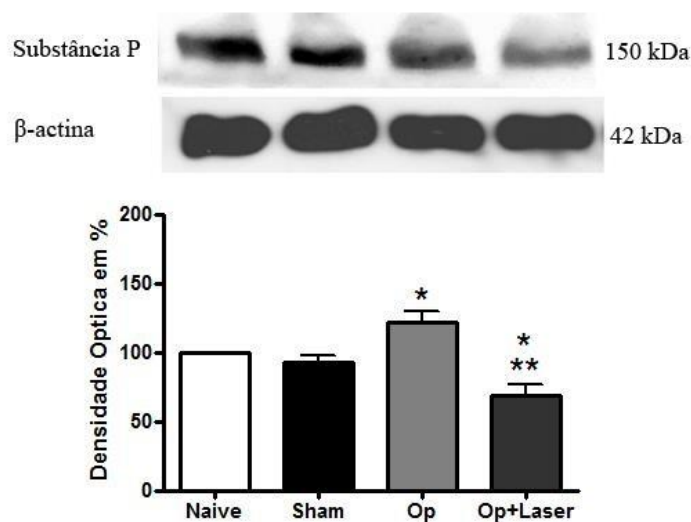
O limiar de alodinia, avaliado pelo teste de Von Frey, expresso em gramas, foi avaliado antes (MI) de qualquer procedimento, 2 dias (1s) após lesão e após sessões com laser de baixa intensidade (s). Os resultados apresentam a média \pm epm de 5 animais por grupo. # $p < 0,05$ em comparação com o grupo Op. * $p < 0,05$ em comparação a medida inicial.

5.2 EFEITO SOBRE A EXPRESSÃO DE SP

Nos resultados de *immunoblotting* para Substância P (n=5), podemos observar um aumento na densidade óptica das bandas marcadas para Substância P no gânglio trigeminal no grupo de animais operados (Op) quando comparado com o grupo controle (naive). Após as 10 sessões de laserterapia no grupo Op + laser foi observado uma diminuição na expressão de Substância P, quando comparado com as bandas do grupo usados como controle (naive e sham) e ao grupo operado sem tratamento.

Ainda, não foi possível observar alteração significativa no grupo falso-operado (sham, também utilizado como controle) em relação ao naive. A densidade média para o grupo controle, naive, foi considerada 100% (figura 5.2).

Figura 5.2 - Efeito do tratamento com laser sobre a expressão de Substância P no Gânglio trigeminal.



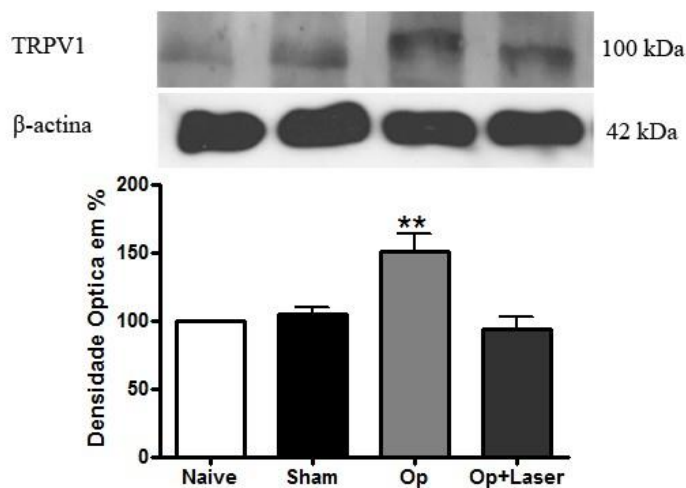
Os resultados representam a média±epm de 5 animais por grupo. * p < 0,05 comparado com os grupos controle (naive e sham) e ** p < 0,01 comparado com o grupo Op.

5.3 EFEITO SOBRE A EXPRESSÃO DO TRPV-1

Nos resultados de *immunoblotting* para TRPV-1 P (n=5), podemos observar um aumento na densidade óptica das bandas marcadas para TRPV-1 no gânglio trigeminal no grupo de animais operados (Op) quando comparado com o grupo controle (naive). Após as 10 sessões de laserterapia no grupo Op + laser foi observado uma diminuição na expressão de TRPV-1, de aproximadamente 20% quando comparado com as bandas do grupo naive.

Ainda não foi possível observar alteração significativa no grupo falso-operado (sham + laser – também utilizado como controle) em relação ao naive. A densidade média para o grupo controle naive foi considerada 100% (figura 5.3)

Figura 5.3 - Efeito da laserterapia sobre a expressão de TRPV-1 no Gânglio trigeminal



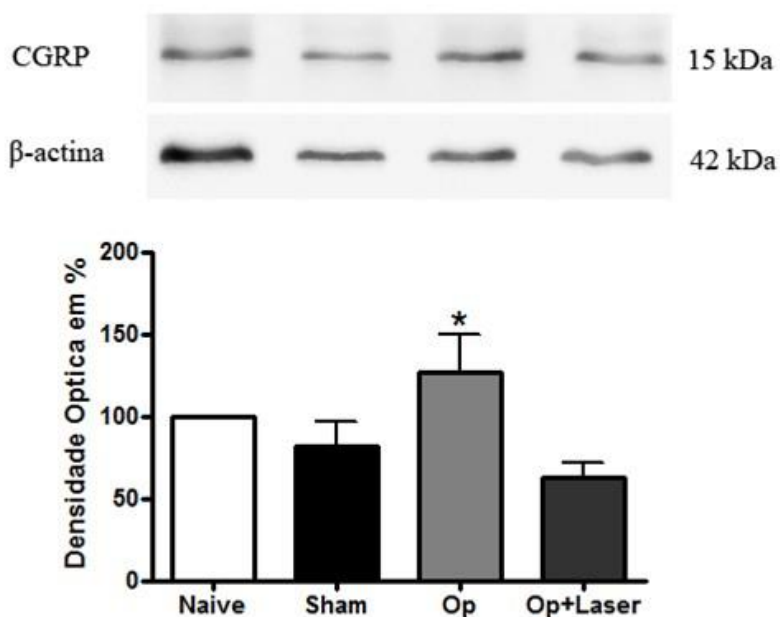
Os resultados representam a média±epm de 5 animais por grupo ** p < 0,01 comparado com os demais grupos.

5.4 EFEITO SOBRE A EXPRESSÃO DE CGRP

Nos resultados de *immunoblotting* para CGRP (n=5), podemos observar um aumento na densidade óptica das bandas marcadas para CGRP no gânglio trigeminal no grupo de animais operados (Op) quando comparado com o grupo controle (naive). Após as 10 sessões de laserterapia no grupo Op + laser foi observado uma diminuição na expressão de CGRP, quando comparado com as bandas do grupo usados como controle (naive e sham) e ao grupo operado sem tratamento.

Ainda, não foi possível observar alteração significativa no grupo falso-operado (sham, também utilizado como controle) em relação ao naive. A densidade média para o grupo controle, naive, foi considerada 100% (figura 5.4).

Figura 5.4 Efeito do tratamento com laser sobre a expressão de CGRP no Gânglio trigeminal.



Os resultados representam a média±epm de 5 animais por grupo. * p < 0,05 comparado com os grupos.

6 DISCUSSÃO

Neste trabalho foi aplicado um modelo de lesão física experimental no disco da articulação temporomandibular e avaliados os efeitos da luz laser de baixa intensidade nos tecidos através de teste quantitativo de sensibilidade, utilizando modelo de alodinia mecânica e avaliação da expressão de proteínas ligadas à atividade neuronal especificamente no núcleo trigeminal, utilizando imunoblotting. Ficou demonstrado que houve reversão total do limiar nociceptivo, bem como a diminuição na expressão da Substância P, do TRPV-1 e do CGRP dos animais tratados com laser.

Esse modelo de lesão utilizado proposto por Toledo et al. (2014), ao nosso ver mimetiza a situação clínica de dor da ATM acometida nos pacientes por problemas intra-articulares, se comparado com os modelos que utilizam soluções medicamentosas ou compostos irritativos. Vale lembrar que nas disfunções articulares do ponto de vista clínico, existe uma maior complexidade pois estas podem ser divididas em disfunções com transtornos do disco articular, luxações e quadros inflamatórios, lembrando que a inflamação intra-articular tem sido considerada como uma fonte de dor na ATM durante o desenvolvimento de DTM (Okeson; de Leeuw, 2011). Este processo inflamatório pode ocorrer na sinóvia, na forma de sinovite, e na cápsula, na forma de capsulite, e pode resultar de um trauma local, infecção, degeneração, ser parte de uma doença do colágeno, ou fazer parte de uma poliartrite sistêmica, por exemplo, artrite reumatoide (Tanaka et al., 2008). As disfunções do disco articular representam a forma mais comum de disfunções articulares, sendo representada mais frequentemente como o deslocamento do disco articular. Este é caracterizado por uma relação anormal ou mal-alinhamento do disco articular e do côndilo, sendo o quadro de dor presente principalmente em situações de deslocamento sem redução do disco articular (Okeson; de Leeuw, 2011).

Após deslocamento anterior do disco sem redução na ATM de coelhos tem sido descritas alterações histopatológicas no disco articular, na zona bilaminar, no osso subcondral, na cartilagem condilar, na eminência articular e na membrana sinovial e estas alterações são caracterizadas por degeneração, formação

microcística, hiper celularidade, hiperplasia cartilaginosa, ossificação, agregação de células inflamatórias e incremento de fibrilas (Ali et al., 1994). Estas alterações histopatológicas segundo o autor são muito similares ao que também é reportado em humanos. Isso mostra que a dor gerada por disfunções na ATM é uma dor com características inflamatórias, mas isso não descarta a presença de componente neuropático nesta dor (Merril, 2007). Isto é válido quando vemos no resultado da expressão do receptor TRPV-1 que tem implicação também na dor neuropática e que teve uma diminuição de sua expressão após a LLLT neste estudo. Tem sido relatado que a ATM pode desenvolver neuropatia periférica e central, e uma vez que isso ocorre, o tratamento precisa focar nos tipos de terapêutica usadas na dor neuropática (Merril, 2007).

A hiperalgesia inflamatória da ATM têm sido correlacionada a distúrbios do disco articular que ocorrem na população de pacientes em geral (Minakuchi et al., 2001), sendo que a dor é considerada um sintoma da doença da ATM (Chang et al., 2014). A terapia com laser de baixa intensidade (LLLT) tem sido usada no tratamento clínico da dor da ATM, conforme descrito a seguir (Chang et al., 2014., Madani et al., 2014; Sayed et al., 2014; Pereira et al., 2014). Em uma revisão sistemática foi demonstrada a eficácia clínica do uso da LLLT e que seu uso nos músculos mastigatórios ou na cápsula articular promovem um efeito analgésico moderado (Chang et al., 2014). Parâmetros adequados que influenciam os efeitos terapêuticos para a dor na ATM permanecem controversos no presente, pois várias doses clínicas, métodos e modos de LLLT também resultam em diferentes efeitos de tratamento. Porém, na potência de saída utilizada nos protocolos de LLLT geralmente menor ou igual a 1000mW e doses terapêuticas menor ou igual a 35J/cm² o laser não prejudica o tecido, sendo capaz de produzir efeitos bioquímicos nas células (Chang et al., 2014). A eficácia da LLLT no tratamento de pacientes com disfunções temporomandibulares foi avaliada e após período de 6 meses, os autores verificaram que esta terapêutica promove resultados satisfatórios em reduzir a intensidade da dor, número de pontos dolorosos, ruídos articulares e melhoria nos movimentos da mandíbula (Sayed et al., 2014). A efetividade da terapia com laser vermelho e infravermelho de baixa intensidade foi avaliada em pacientes e demonstrou que ambos são eficazes no tratamento e remissão dos sintomas de dor nas disfunções temporomandibulares (Pereira et al., 2014). Entretanto, um estudo clínico duplo-cego investigou a eficácia da terapia com LLLT para o tratamento de

pacientes com osteoartrite da ATM e verificou que esta terapia não foi mais eficaz do que o tratamento com placebo para reduzir a dor e melhorar a abertura da boca, o que foi interpretado pelos autores o fato de pacientes afetados com osteoartrite na ATM terem problemas complexos (Madani et al.,2014). Ao nosso ver a utilização do laser no controle da dor intra-articular de pacientes com disfunção temporomandibular é promissora, não invasiva, simples, de baixo custo, sendo eficiente.

Os parâmetros do protocolo de LLLT utilizados no nosso trabalho foram recomendados por um estudo que forneceu uma lista de verificação que nos ajuda a entender e relatar todos os parâmetros necessários para um estudo científico repetível (Jenkins; Carroll, 2011). Esta lista inclui os oito mais importantes parâmetros do feixe que devem ser relatados, tais como: comprimento de onda, energia, tempo de irradiação, área do feixe na superfície da pele ou da cultura— o que não é necessariamente o mesmo que o tamanho da abertura, os parâmetros de pulso, localização anatômica, número de sessões e intervalo entre as sessões. Os três parâmetros de dose comumente usados são o tempo, energia e a densidade de energia. Esse estudo serviu como base para um estudo experimental para análise dos efeitos da LLLT no comportamento nociceptivo na região orofacial em ratos, utilizando um modelo de nocicepção neuropática através de lesão física por esmagamento do nervo alveolar inferior, verificando a diminuição do comportamento nociceptivo após sua aplicação (de Oliveira Martins et al., 2013).

A literatura indica que a LLLT pode afetar o tecido induzindo redução do edema, controle do processo inflamatório, aumento da fagocitose, da síntese de colágeno e da epitelização (Ribeiro, 2004). A luz laser penetra no interior do tecido onde é absorvida por determinados cromóforos, resultando no aumento do metabolismo celular por meio do aumento da síntese de ATP pelas mitocôndrias (Karu, 1999). A LLLT promove efeitos semelhantes de modulação da inflamação e analgesia do que a medicação anti-inflamatória não esteroide, além de estimular a microcirculação local e a proliferação celular, favorecendo ainda mais os eventos de reparação no pós-operatório (Rochkind et al., 2001; Shamir et al., 2001). Outros estudos confirmam os efeitos favoráveis da LLLT na redução da sintomatologia dolorosa (Albrektsson; Hansson, 1986), restauração da função neural após o dano (Miloro et al., 2002) e a aceleração de cicatrização (Amorim et al., 2006; Gal et al., 2009). A terapia de laser de baixa potência também possui efeitos terapêuticos como, por exemplo, o aprimoramento da remodelação e reparo ósseo, normalização da função hormonal, estímulo de liberação de endorfina e modulação do sistema imune (Rochkind et al., 2001).

Em um estudo que avaliou os efeitos da LLLT no processo inflamatório na ATM do rato induzido por carragenina, ficou demonstrada uma diminuição do infiltrado inflamatório bem como a diminuição das camadas de células da membrana sinovial (Carvalho et al., 2011). Outro estudo experimental em ratos para avaliação dos efeitos da LLLT sobre a inflamação induzida por injeção de carragenina ou formalina na ATM, demonstrando atividade anti-inflamatória, possivelmente devido a modulação do processo inflamatório e início precoce do processo de reparo (Barretto et al., 2013). Alguns estudos demonstram a redução da intensidade da resposta inflamatória podendo estar relacionado com a inibição induzida pelo laser no ciclo da enzima ciclooxigenase, em especial a COX2, uma isoenzima responsável pela produção de prostaglandinas, em especial a Prostaglandina E2, vinda do ácido aracdônico (Chagas et al., 2015). Esses mediadores bioquímicos estão envolvidos no desenvolvimento dos eventos vasculares durante o processo de inflamação na articulação. Em nosso trabalho, foi observada reversão total do limiar nociceptivo dos animais tratados com laser, a partir da primeira sessão no grupo operado mais laser, e a partir da segunda sessão no grupo falso operado mais laser, e se manteve até a décima sessão analisada, sugerindo a efetividade da LLLT na diminuição da nocicepção, provavelmente pela redução do processo inflamatório intra-articular. Muito provável que ocorra também a efetividade do laser na diminuição do grau de edema, pois quanto mais intenso for, maior será a sentitização central dos neurônios periféricos em resposta a inflamação periférica (Barretto et al., 2013). Também, outro estudo experimental para análise o efeito da LLLT na artrite da ATM por indução com CFA, verificou a diminuição do processo inflamatório crônico, a melhora na reparação, a modulação na atividade de enzimas que agem no remodelamento da matriz tecidual, havendo diminuição na espessura do disco articular (Lemos et al., 2016). Sabe-se que a inibição da síntese de prostaglandinas induzida pela LLLT promove o aumento da proliferação celular endotelial (Moore et al., 2005). Também, pode estimular efeitos nos linfócitos produzindo fatores de crescimento que podem modular a proliferação celular in vitro (Agaiby et al., 2000). Estes efeitos poderiam induzir uma neovascularização na área retrodiscal, favorecendo a remoção dos restos teciduais bem como dos fatores inflamatórios decorrentes da lesão, bem como propiciar a reparação do tecido retrodiscal.

Utilizamos como modelo de lesão experimental da articulação temporomandibular, o proposto por Toledo et al. (2014), no qual é realizada uma lesão

unilateral do disco articular, por acesso cirúrgico, obtida por esmagamento do disco por 10 segundos no sentido anteroposterior. Em seu trabalho os mesmos autores avaliaram a relação dessa lesão com o crescimento mandibular, encontrando diferenças significantes entre os lados (Toledo et al., 2014). Outros modelos são utilizados para o estudo da inflamação ou da nocicepção na ATM, representados pela injeção de substâncias flogísticas, como formalina (Goulart et al., 2005; Barretto et al., 2013), carragenina (Goulart et al., 2005; Carvalho et al., 2011; Barretto et al., 2013), CFA na articulação (Lemos et al., 2016; Hutchins et al., 2000) ou, ainda, óleo de mostarda (Bonjardim et al., 2009). O CFA tem sido utilizado também em modelos de dor inflamatória (Chacur et al., 2009). No caso deste trabalho, o uso do modelo físico de dor por lesão no disco da ATM seria mais próximo da realidade, pois ao nosso ver, mimetiza a situação clínica de dor da ATM acometida nos pacientes por problemas intra-articulares, se comparado com os modelos que utilizam soluções medicamentosas ou compostos irritativos. Também o uso de métodos físicos tem sido descritos, como o forçamento do deslocamento do disco através de abertura excessiva da boca em coelhos (Fujisawa et al., 2003), indução cirúrgica do deslocamento do disco (Ali; Sharawy, 1994), discectomia para alteração das circunstâncias mecânicas no espaço intracapsular em coelhos (Takatsuka et al., 1996) ou em macacos (Bjørnland et al., 1999) e perfuração do disco articular em coelhos (Axelsson et al., 1992; Sato et al., 1998). Esses modelos apresentam maior dificuldade de realização, com maior tempo sob efeito da anestesia geral ou procedimentos cirúrgicos mais complexos e que só podem ser realizados em animais de maior porte que o rato. Esses diversos modelos animais são projetados para imitar doenças clínicas distintas para melhor avaliar os mecanismos subjacentes e potenciais tratamentos, sendo que esse número de modelos animais desenvolvidos reflete o fato de que os fenótipos de dor são mediados por mecanismos distintos (Gregory et al., 2013).

Diferentes estímulos são necessários para avaliar a integridade das fibras aferentes e compreender melhor os mecanismos envolvidos em diferentes condições dolorosas que podem afetar a região orofacial, sendo que os testes quantitativos sensoriais (TQS), que fornecem um valor numérico a um dado subjetivo e consistem em uma maneira confiável de se avaliar as fibras nervosas (Sydney; Conti, 2011). Estes são usados como base de referência para verificar a eficácia de uma determinada modalidade de tratamento e meio de avaliação em pesquisas

científicas. O TQS por nós escolhido foi o teste de Von Frey. O kit contém monofilamentos de náilon de diferentes diâmetros calibrados para exercer forças específicas que aumentam conforme também aumenta o calibre do monofilamento. Cada monofilamento é aplicado perpendicularmente à região a ser avaliada e uma leve pressão é aplicada até o filamento curvar-se. Os monofilamentos adaptados por Semmes-Weinstein são utilizados para determinação do limiar tátil na região orofacial, através da avaliação das fibras A-beta e A-delta, observando-se o fenômeno da alodinia. A dor na ATM é normalmente associada a vermelhidão, edema e alodinia na pele sobre a articulação, sendo que essas reações são moduladas pela liberação de neurotransmissores periféricos no espaço articular causando sensibilização periférica (Merril, 2007). No presente trabalho, as avaliações foram iniciadas após dois dias para garantir o início do quadro de nocicepção. Assim, ao observarmos através do teste de von Frey que houve reversão total do limiar nociceptivo, concluímos que o laser de baixa intensidade foi efetivo no controle da dor articular. Acreditamos que este método seria mais adequado para avaliar a dor na ATM pois este permite quantificar a alodinia e delimita a sua localização. Outros testes são utilizados para a avaliação do fenômeno doloroso na região orofacial, como aquele que mensura o comportamento nociceptivo através da contagem de movimentos de esfregacos com a pata dianteira ou traseira ipsilateral na região operada (assimétrica) e os movimentos de balanceio da cabeça, no período de recuperação pos-anestésica por 45 minutos (Levin et al., 1978; Jacobs et al., 2002; Sydney; Conti, 2011; Barretto et al., 2013; Desiderá et al., 2015).

Estudos tem reportado que neurônios do gânglio trigeminal (GT) tem interações funcionais uns com os outros, e as interações neuronais entre os neurônios do GT são conhecidas por estarem envolvidas no aumento da resposta nociva em neurônios aferentes primários inervando tecidos orofaciais após

inflamação ou lesão de tecidos adjacentes (Takeda et al., 2005). Estas alterações podem ser atribuídas a própria ou ao ambiente alterado encontrado no tecido do local da lesão, estabelecendo uma condição caracterizada por alodinia e hiperalgesia. Uma questão avaliada neste projeto foi como a lesão no disco da ATM alteraria a expressão de substâncias algogênicas e receptores sabidamente envolvidos na instalação do quadro hipernociceptivo e como eles contribuiriam para a manutenção desse estado.

O receptor de potencial transiente vanilóide do subtipo 1 (TRPV-1) é altamente expresso em neurônios sensoriais primários de pequeno diâmetro no gânglio da raiz dorsal (DRG) e no GT (Tominaga, 2010). Na literatura, o envolvimento do TRPV-1 na geração de dor inflamatória já foi bem detalhado em estudos com animais knock out (Caterina et al., 2000; Davis et al., 2000) e também com o uso de diferentes antagonistas para TRPV-1 (Garcia-Martinez et al., 2002; Walker et al., 2003) entretanto, o papel do TRPV-1 em situações de dor crônica é menos documentado. Sabe-se que TRPV-1 é essencial para modalidades seletivas da sensação por estímulos químicos e térmicos e para hiperalgesia térmica induzida por lesão (Caterina et al., 2000). Em nossos resultados observamos que a lesão no disco da ATM levou ao aumento da expressão do TRPV-1 sendo que esta regulação foi concomitante com a redução do limiar nociceptivo dos animais submetidos a lesão no disco da ATM. Somado aos dados de que após o tratamento com laser houve reversão do comportamento hipernociceptivo paralelamente a redução da expressão proteica deste receptor, podemos inferir que o TRPV-1 pode estar relacionado com a instalação do quadro hipernociceptivo em nosso modelo. Entretanto um estudo com material de biópsia com pacientes com dor articular da ATM indicou que o TRPV-1 pode ter um papel na manutenção da condição fisiológica da ATM (Sato et al., 2005).

A substância P (SP) é um neuropeptídeo composto por uma cadeia de 11 resíduos de aminoácidos que atua como neuromodulador. A substância P facilita processos inflamatórios, vômito, ansiedade e nocicepção (resposta a dor). Pode ser encontrada tanto no sistema nervoso central quanto no periférico, e liberada a partir de aferentes nociceptivos primários e está envolvida na nocicepção. As ações biológicas da SP podem ser mediadas através da ativação de três diferentes receptores neuroquinina (NK) denominados NK1, NK2 e NK3, mas os receptores NK1 demonstram uma afinidade preferencial para SP (Satake, 1998).

Além disso, a estimulação das fibras aferentes periféricas resulta na liberação de SP dentro do gânglio trigeminal, e essa liberação é aumentada de modo significativo após inflamação orofacial (Neubert et al., 2000; Hutchins et al., 2000). Estes dados sugerem fortemente que a SP periférica desempenha um papel no processo nociceptivo trigeminal (Bowles et al., 2003; Caviedes-Bucheli et al., 2006; Awawdeh et al., 2002). No entanto, considerando a dor orofacial, poucos estudos têm demonstrado o envolvimento do sistema periférico SP/NK1 em hiperalgesia inflamatória e alodinia experimental (Takeda et al., 2005; Denadai-Souza et al., 2009). Em nossos resultados observamos que a lesão no disco da ATM levou ao aumento da expressão da SP sendo que esta regulação foi concomitante com a redução do limiar nociceptivo dos animais submetidos a lesão no disco da ATM. Somado aos dados de que após o tratamento com laser houve reversão do comportamento hipernociceptivo paralelamente a redução da expressão proteica desse neurotransmissor, podemos inferir que a SP pode estar relacionada com a instalação do quadro hipernociceptivo em nosso modelo. Também, um estudo com pacientes com disfunções temporomandibulares e um grupo controle, mostrou maior nível de SP no líquido sinovial dos pacientes com disfunções (Li et al., 2015).

Outro componente importante no processamento nociceptivo é o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP). O CGRP é um neuropeptídeo 37- amino-ácido que pertence a uma família de neuropeptídeos que inclui calcitonina, adrenomedulina e amilina. O CGRP é largamente distribuído no sistema nervoso e na via dolorosa trigeminal, nos níveis central e periférico (Hansen; Ashina, 2014). Foi mostrado que a aplicação de CGRP, produz uma excitação lenta e prolongada em neurônios no corno dorsal, que evidencia que o CGRP tem um efeito sobre a atividade excitatória neuronal, o que implica que o CGRP pode promover a transmissão da informação nociceptiva no corno dorsal da medula espinal (Bird et al., 2006; Sun et al., 2004; Yu et al., 2002). Adicionalmente, o CGRP pode facilitar a nocicepção por retardar o metabolismo da SP e, também, por aumentar a liberação de SP e de glutamato nas terminações centrais das fibras aferentes primárias (Oliveira et al., 2010). Em nossos resultados observamos que a lesão no disco da ATM levou ao aumento da expressão do CGRP sendo que esta regulação foi concomitante com a redução do limiar nociceptivo dos animais submetidos a lesão no disco da ATM. Somado aos dados de que após o tratamento com laser houve reversão do comportamento hipernociceptivo paralelamente a redução da expressão

proteica desse peptídeo, podemos inferir que o CGRP pode estar relacionado com a instalação do quadro hipernociceptivo em nosso modelo. Um estudo que avaliou a nocicepção na ATM de ratos pelo uso do CFA, mostrou aumento significativo do CGRP (Kramer et al., 2010). Também, em um estudo em pacientes com dor articular em disfunções temporomandibulares e grupo controle, após análise do tecido sinovial coletado, foi observado um aumento da expressão do CGRP no grupo com disfunção, sugerindo um papel do peptídeo no mecanismo de produção da dor (Sato et al., 2004).

A lesão no disco articular da ATM do modelo utilizado neste trabalho produziu dor confirmada pela alodinia e pela expressão da Substância P, do TRPV-1 e do CGRP no núcleo trigeminal, mostrando ser esse modelo viável para a análise do comportamento nociceptivo e da atividade neuronal do núcleo trigeminal. Também, ficou demonstrado que a aplicação do LLLT conseguiu controlar a dor produzida. O protocolo de LLLT utilizado poderá ser útil no controle clínico de pacientes com dor na ATM relacionada a lesão do disco articular, seja por incoordenação condilo-disco, seja de origem traumática.

7 CONCLUSÕES

Com este trabalho, que analisou os efeitos da laserterapia no comportamento nociceptivo e na atividade neuronal do núcleo trigeminal após lesão unilateral do disco da articulação temporomandibular (ATM) em ratos, foi possível concluir que:

- O tratamento com laserterapia de baixa intensidade foi capaz de reverter a partir da segunda sessão a nocicepção induzida pela lesão do disco articular; e se manteve ao longo das sessões.

- Houve aumento da expressão da Substância P - neurotransmissor comumente aumentado pela inflamação orofacial, do TRPV-1 – receptor associado a dor neuropática e inflamatória e do CGRP - neuropeptídeo presente na via dolorosa trigeminal, no gânglio trigeminal após a lesão do disco articular e uma diminuição de sua respectiva expressão após a laserterapia;

- O modelo de análise do comportamento nociceptivo e da atividade neuronal do núcleo trigeminal após lesão unilateral do disco da ATM é viável;

- O protocolo de LLLT utilizado poderá ser útil no controle clínico de pacientes com dor na ATM relacionada a lesão do disco articular, seja por incoordenação cêndilo-disco, seja de origem traumática.

REFERÊNCIAS¹

Agaiby AD, Ghali LR, Wilson R, Dyson M. Laser modulation of angiogenic factor production by T-lymphocytes. *Lasers Surg Med.* 2000;26(4):357-63.

Aghabeigi B. The pathophysiology of pain. *Br Dent J.* 1992;173(3):91-7.

Albrektsson T, Hansson HA. An ultrastructural characterization of the interface between bone and sputtered titanium or stainless steel surfaces. *Biomaterials.* 1986 May;(3):201-5.

Ali AM, Sharawy MM. Histopathological changes in rabbit craniomandibular joint associated with experimentally induced anterior disk displacement (ADD). *J Oral Pathol Med.* 1994 Sep;23(8):364-74.

Amaya F, Oh-hashii K, Naruse Y, Iijima N, Ueda M, Shimosato G, Tominaga M, Tanaka Y, Tanaka M. Local inflammation increases vanilloid receptor 1 expression within distinct subgroups of DRG neurons. *Brain Res.* 2003 Feb;963(1-2):190-6.

Amorim J.C, de Sousa GR, de Barros Silveira L, Prates R.A, Pinotti M., Ribeiro M.S. Clinical study of the gingival healing after gingivectomy and low-level laser therapy. *Photomed Laser Surg.* 2006 Oct;24(5):588-94.

Awawdeh L, Lundy FT, Shaw C, Lamey PJ, Linden GJ, Kennedy JG. Quantitative analysis of substance P, neurokinin A and calcitonin gene-related peptide in pulp tissue from painful and healthy human teeth. *Int Endod J.* 2002 Jan;35(1):30-6.

Axelsson S, Holmlund A, Hjerpe A. An experimental model of osteoarthritis in the temporomandibular joint of the rabbit. *Acta Odontol Scand.* 1992;50(5):273-80.

Bae YC, Oh JM, Hwang SJ, Shigenaga Y, Valtschanoff JG. Expression of vanilloid receptor TRPV1 in the rat trigeminal sensory nuclei. *J Comp Neurol.* 2004;478(1):62-71.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

Barretto SR, de Melo GC, dos Santos JC, de Oliveira MG, Pereira-Filho RN, Alves AV, Ribeiro MA, Lima-Verde IB, Quintans Júnior LJ, de Albuquerque-Júnior RL, Bonjardim LR. Evaluation of anti-nociceptive and anti-inflammatory activity of low-level laser therapy on temporomandibular joint inflammation in rodents. *J Photochem Photobiol B*. 2013 Dec 5;129:135-42. doi: 10.1016/j.photobiol.2013.10.002.

Bird GC, Han JS, Fu Y, Adwanikar H, Willis WD, Neugebauer V. Pain-related synaptic plasticity in spinal dorsal horn neurons: role of CGRP. *Mol Pain*. 2006 Sep;2:31.

Bjørnland T, Haanaes HR. Discectomy of the temporomandibular joint: an experimental study in monkeys. *J Craniomaxillofac Surg*. 1999 Apr;27(2):113-6.

Bonjardim LR, da Silva AP, Gameiro GH, Tambeli CH, Ferraz de Arruda Veiga MC. Nociceptive behavior induced by mustard oil injection into the temporomandibular joint is blocked by a peripheral non-opioid analgesic and a central opioid analgesic. *Pharmacol Biochem Behav*. 2009 Jan;91(3):321-6.

Bowles WR, Withrow JC, Lepinski AM, Hargreaves KM. Tissue levels of immunoreactive substance P are increased in patients with irreversible pulpitis. *J Endod*. 2003 Apr;29(4):265-7.

Breese NM, George AC, Pauers LE, Stucky CL. Peripheral inflammation selectively increases TRPV1 function in IB4-positive sensory neurons from adult mouse. *Pain*. 2005 May;115(1-2):37-49.

Carvalho CM, Lacerda JA, dos Santos Neto FP, de Castro IC, Ramos TA, de Lima FO, de Cerqueira Luz JG, Ramalho MJ, dos Santos JN, Pinheiro AL. Evaluation of laser phototherapy in the inflammatory process of the rat's TMJ induced by carrageenan. *Photomed Laser Surg*. 2011 Apr;29(4):245-54. doi:10.1089/pho.2009.2685.

Cascone P, Scopelliti D, Capuano A, Borracchini A. [Macroscopic anatomy of the temporomandibular joint]. *Minerva Stomatol*. 1987;36(11): 845-56. Italian.

Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitz KR, Koltzenburg M, Basbaum AI, Julius D. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science*. 2000;Apr;288(5464):306-13.

Caviedes-Bucheli J, Lombana N, Azuero-Holguin MM, Munoz HR. Quantification of neuropeptides (calcitonin gene-related peptide, substance P, neurokinin A, neuropeptide Y and vasoactive intestinal polypeptide) expressed in healthy and inflamed human dental pulp. *Int Endod J*. 2006,May; 39(5):394-400.

Chacur M, Lambertz D, Hoheisel U, Mense S. Role of spinal microglia in myositis-induced central sensitisation: an immunohistochemical and behavioural study in rats. *Eur J Pain*. 2009 Oct;13(9):915-23.

Chagas LR, Silva JA Jr, de Almeida Pires J, Costa MS. Expression of mPGES-1 and IP mRNA is reduced by LLLT in both subplantar and brain tissues in the model of peripheral inflammation induced by carrageenan. *Lasers Med Sci*. 2015 Jan;30(1):83-8. doi:10.1007/s10103-014.1622-4.

Chang WD, Lee CL, Lin HY, Hsu YC, Wang CJ, Lai PT. A Meta-analysis of Clinical Effects of Low-level Laser Therapy on Temporomandibular Joint Pain. *J Phys Ther Sci*. 2014 Aug;26(8):1297-300. doi:10.1589/jpts.26.1297.

Chaplan SR, Bach, F.W., Pogrel, J.W., Chung, J.M. & Yaksh, T.L. . Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods*. 1994;53:55-63.

Chidiac JJ, Rifai K, Hawwa NN, Massaad CA, Jurjus AR, Jabbur SJ, Saade NE. Nociceptive behaviour induced by dental application of irritants to rat incisors: a new model for tooth inflammatory pain. *Eur J Pain*. 2002; 6(1): 55-67.

Davis JB, Gray J, Gunthorpe MJ, Hatcher JP, Davey PT, Overend P, Harries MH, Latcham J, Clapham C, Atkinson K, Hughes SA, Rance K, Grau E, Harper AJ, Pugh PL, Rogers DC, Bingham S, Randall A, Sheardown SA. Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature*. 2000May;405(6783):183-7.

De Kanter RJ, Truin GJ, Burgersdijk RC, Van 't Hof MA, Battistuzzi PG, Kalsbeek H, Käyser AF. Prevalence in the Dutch adult population and a meta-analysis of signs and symptoms of temporomandibular disorder. *J Dent Res*. 1993 Nov;72(11):1509-18.

de Oliveira Martins D, Martinez dos Santos F, Evany de Oliveira M, de Britto LR, Benedito Dias Lemos J, Chacur M. Laser therapy and pain-related behavior after injury of the inferior alveolar nerve: possible involvement of neurotrophins. *J Neurotrauma*. 2013;30(6):480-6.

Denadai-Souza A, Camargo Lde L, Ribela MT, Keeble JE, Costa SK, Muscara MN. Participation of peripheral tachykinin NK1 receptors in the carrageenan-induced inflammation of the rat temporomandibular joint. *Eur J Pain*. 2009;13(8):812-9. doi:10.1016/j.ejpain.2008.09.012.

Desiderá AC, Nascimento GC, Gerlach RF, Leite-Panissi CR. Laser therapy reduces gelatinolytic activity in the rat trigeminal ganglion during temporomandibular joint inflammation. *Oral Dis*. 2015 Jul;21(5):652-8. doi: 10.1111/odi12330.

Fan W, Huang F, Wu Z, Zhu X, Li D, He H. Carbon monoxide: a gas that modulates nociception. *J Neurosci Res*. 2011 Jun;89(6):802-7.

Freitas, PM, Simoes A. *Lasers in dentistry: guide for clinical practice*. USA: Wiley Blackwell; 2015.

Fricton JR. Clinical care for myofascial pain. *Dent Clin North Am*. 1991 Jan;35(1):1-28.

Fujisawa T, Kuboki T, Kasai T, Sonoyama W, Kojima S, Uehara J, Komori C, Yatani H, Hattori T, Takigawa M. A repetitive, steady mouth opening induced an osteoarthritis-like lesion in the rabbit temporomandibular joint. *J Dent Res*. 2003 Sep;82(9):731-5.

Fukuoka T, Tokunaga A, Tachibana T, Dai Y, Yamanaka H, Noguchi K. VR1, but not P2X(3), increases in the spared L4 DRG in rats with L5 spinal nerve ligation. *Pain*. 2002 Sep;99(1-2):111-20.

Gal P, Mokry M, Vidinsky B, Kilik R, Depta F, Harakalova M, Longauer F, Mozes S, Sabo J. Effect of equal daily doses achieved by different power densities of low-level laser therapy at 635 nm on open skin wound healing in normal and corticosteroid-treated rats. *Lasers Med Sci*. 2009 Jul;24(4):539-47. doi: 10.1007/210103-008-0604-9.

Garcia-Martinez C, Humet M, Planells-Cases R, Gomis A, Caprini M, Viana F, De La Pena E, Sanchez-Baeza F, Carbonell T, De Felipe C, Perez-Paya E, Belmonte C, Messeguer A, Ferrer-Montiel A. Attenuation of thermal nociception and hyperalgesia by VR1 blockers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(4):2374-9.

Goulart AC, Correia FA, Sousa SC, Luz JG. Study of the inflammatory process induced by injection of carrageenan or formalin in the rat temporomandibular joint. *Braz Oral Res*. 2005 Apr-Jun;19(2):99-105.

Gregory NS, Harris AL, Robinson CR, Dougherty PM, Fuchs PN, Sluka KA. An overview of animal models of pain: disease models and outcome measures. *Pain*. 2013 Nov;14(11):1255-69. doi: 10.1016/j.pain.2013.06.008.

Hansen JM, Ashina M. Calcitonin gene-related peptide and migraine with aura: A systematic review. *Cephalalgia*. 2014 Jan;34(9):695-707.

Hudson LJ, Bevan S, Wotherspoon G, Gentry C, Fox A, Winter J. VR1 protein expression increases in undamaged DRG neurons after partial nerve injury. *Eur J Neurosci*. 2001 Jun;13(11):2105-14.

Hutchins B, Spears R, Hinton RJ, Harper RP. Calcitonin gene-related peptide and substance P immunoreactivity in rat trigeminal ganglia and brainstem following adjuvant-induced inflammation of the temporomandibular joint. *Arch Oral Biol*. 2000 Apr;45(4):335-45.

IASP: International Association for the study of pain. Subcommittee on Taxonomy. Classification of chronic pain, descriptions of chronic pain syndromes and definition of pain terms. *Pain*. 1986;3(Suppl):11-225.

Jacobs R, Wu CH, Van Loven K, Desnyder M, Kolenaar B, Van Steenberghe D. Methodology of oral sensory tests. *J Oral Rehabil*. 2002;29(8):720-30.

Jenkins PA, Carroll JD. How to report low-level laser therapy (LLLT)/photomedicine dose and beam parameters in clinical and laboratory studies. *Photomed Laser Surg*. 2011 Dec;29(12):785-7. doi: 10.1089/pho.2011.9895.

Kanai Y, Nakazato E, Fujiuchi A, Hara T, Imai A. Involvement of an increased spinal TRPV1 sensitization through its up-regulation in mechanical allodynia of CCI rats. *Neuropharmacology*. 2005 Dec;49(7):977-84.

Karu T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *J Photochem Photobiol B*. 1999 May;49(1): -17.

Kim HY, Park CK, Cho IH, Jung SJ, Kim JS, Oh SB. Differential Changes in TRPV1 expression after trigeminal sensory nerve injury. *J Pain*. 2008 May;9(3):280-8. doi: 10.1016/j.jpain.2007.11.013.

Kramer PR, Kerins CA, Schneiderman E, Bellinger LL. Measuring persistent temporomandibular joint nociception in rats and two mice strains. *Physiol Behav.* 2010 Apr 19;99(5):669-78. doi: 10.1016/j.physbeh.2010.01.037.

Lazarov NE. Comparative analysis of the chemical neuroanatomy of the mammalian trigeminal ganglion and mesencephalic trigeminal nucleus. *Prog Neurobiol.* 2002 Jan 66(1):19-59.

Lazarov NE. The mesencephalic trigeminal nucleus in the cat. *Adv Anat Embryol Cell Biol.* 2000;153:iii-xiv, 1-103.

Lemos GA, Rissi R, de Souza Pires IL, de Oliveira LP, de Aro AA, Pimentel ER, Palomari ET. Low-level laser therapy stimulates tissue repair and reduces the extracellular matrix degradation in rats with induced arthritis in the temporomandibular joint. *Lasers Med Sci.* 2016 Aug;31(6):1051-9. doi: 10.1007/s10103-016-1946-3.

Levin S, Pearsall G, Ruderman RJ. Von Frey's method of measuring pressure sensibility in the hand: an engineering analysis of the Weinstein-Semmes pressure aesthesiometer. *J Hand Surg Am.* 1978 May;3(3):211-6.

Li W, Long X, Jiang S, Li Y, Fang W. Histamine and substance P in synovial fluid of patients with temporomandibular disorders. *J Oral Rehabil.* 2015 May;42(5):363-9. doi: 10.1111/joor.12265.

Lin Q, Li D, Xu X, Zou X, Fang L. Roles of TRPV1 and neuropeptidergic receptors in dorsal root reflex-mediated neurogenic inflammation induced by intradermal injection of capsaicin. *Mol Pain.* 2007 Oct;3:30.

Luo H, Cheng J, Han JS, Wan Y. Change of vanilloid receptor 1 expression in dorsal root ganglion and spinal dorsal horn during inflammatory nociception induced by complete Freund's adjuvant in rats. *Neuroreport.* 2004 Mar; 15(4):655-8.

Luz JG, Maragno IC, Martin MC. Characteristics of chief complaints of patients with temporomandibular disorders in a Brazilian population. *J Oral Rehabil.* 1997 Mar;24(3):240-3.

Machado AV. *neuroatomia funcional.* Rio de Janeiro: Atheneu;1993.

Madani AS, Ahrari F, Nasiri F, Abtahi M, Tunér J. Low-level laser therapy for management of TMJ osteoarthritis. *Cranio.* 2014 Jan;32(1):38-44.

Madeira MC. Anatomia da face. 2.ed. São Paulo: Sarvier; 1997.

Mcneill, C. Temporomandibular disorders and related pain conditions. Progress in pain research and management. Seattle: IASP Press; 1995.

Merrill RL. Central mechanisms of orofacial pain. Dent Clin North Am. 2007 Jan; 51(1):45-59.

Miloro M, Halkias LE, Mallery S, Travers S, Rashid RG. Low-level laser effect on neural regeneration in Gore-Tex tubes. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2002 Jan; 93(1):27-34.

Minakuchi H, Kuboki T, Matsuka Y, Maekawa K, Yatani H, Yamashita A., Kuboki T., Matsuka Y, Maekawa. Randomized controlled evaluation of non-surgical treatments for temporomandibular joint anterior disk displacement without reduction. J Dent Res. 2001 Mar; 80(3):924-8.

Mohl ND. A articulação temporomandibular. In: Mohl ND, Zarb G A, Carlsson G E, Rugh J D. Fundamentos de oclusão. São Paulo: Quintessence; 1989. p.89-106.

Moore P, Ridgway TD, Higbee RG, Howard EW, Lucroy MD. Effect of wavelength on low-intensity laser irradiation-stimulated cell proliferation in vitro. Lasers Surg Med. 2005 Jan; 36(1):8-12.

Nagamine K, Ozaki N, Shinoda M, Asai H, Nishiguchi H, Mitsudo K, Tohnai I, Ueda M, Sugiura Y. Mechanical allodynia and thermal hyperalgesia induced by experimental squamous cell carcinoma of the lower gingiva in rats. J Pain. 2006; 7(9):659-70.

Nascimento PM. Efeito da variação da intensidade e do comprimento de onda do Laser não cirúrgico em feridas cirúrgicas em dorso de ratos: estudo histológico São José dos Campos: Universidade do Vale do Paraíba; 2001.

Neubert JK, Maidment NT, Matsuka Y, Adelson DW, Kruger L, Spigelman I. Inflammation-induced changes in primary afferent-evoked release of substance P within trigeminal ganglia in vivo. Brain Res. 2000 Jul; 871(2):181-91.

Obata K, Yamanaka H, Kobayashi K, Dai Y, Mizushima T, Katsura H, Fukuoka T, Tokunaga A, Noguchi K. Role of mitogen-activated protein kinase activation in injured and intact primary afferent neurons for mechanical and heat hypersensitivity after spinal nerve ligation. *J Neurosci*. 2004;24(45):10211-22.

Ogus HD, Toller PA. *Common disorders of the temporomandibular joint*. Bristol: John Wright; 1981. p. 105.

Okeson JP, de Leeuw R. Differential diagnosis of temporomandibular disorders and other orofacial pain disorders *Dent Clin North Am*. 2011 Jan;55(1):105-20. doi:10.1016/j.cden.2010.08.007.

Oliveira CMB, Issy AM, Sakata RK. Fisiopatologia da dor pós-operatória, *Rev Bras Med*. 2010 Nov;67(11):415-8.

Pereira TS, Flecha OD, Guimarães RC, de Oliveira D, Botelho AM, Ramos Glória JC, Aguiar Tavano KT. Efficacy of red and infrared lasers in treatment of temporomandibular disorders--a double-blind, randomized, parallel clinical trial. *Cranio*. 2014 Jan;32(1):51-6.

Pietrobon D, Striessnig J. Neurobiology of migraine. *Nat Rev Neurosci*. 2003;4(5):386-98.

Pomonis JD, Harrison JE, Mark L, Bristol DR, Valenzano KJ, Walker K. N-(4-Tertiarybutylphenyl)-4-(3-chlorophenyl)-1H-tetrahydropyridazin-5(1H)-one (BCTC), a novel, orally effective vanilloid receptor 1 antagonist with analgesic properties: II. in vivo characterization in rat models of inflammatory and neuropathic pain. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003 Jul;306(1):387-93.

Prasad S, Galetta S. Trigeminal neuralgia: historical notes and current concepts. *Neurologist*. 2009 Mar; 15(2): 87-94. doi: 10.1097/NRL.0b013e3181775ac3.

Rashid MH, Inoue M, Kondo S, Kawashima T, Bakoshi S, Ueda H. Novel expression of vanilloid receptor 1 on capsaicin-insensitive fibers accounts for the analgesic effect of capsaicin cream in neuropathic pain. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003 Mar;304(3):940-8.

Ribeiro MSZ, Laser em baixa intensidade. *A Odontologia e o Laser*; 2004. p. 217.

Ro JY, Lee JS, Zhang Y. Activation of TRPV1 and TRPA1 leads to muscle nociception and mechanical hyperalgesia. *Pain*. 2009Aug;144(3):270-7. doi: 10.1016/j.pain.2009.04.021.

Rochkind S, Nissan M, Alon M, Shamir M, Salame K. Effects of laser irradiation on the spinal cord for the regeneration of crushed peripheral nerve in rats. *Lasers Surg Med*. 2001; 28(3):216-9.

Rochkind S, Drory V, Alon M, Nissan M, Ouaknine GE. Laser phototherapy (780 nm), a new modality in treatment of long-term incomplete peripheral nerve injury: a randomized double-blind placebo-controlled study. *Photomed Laser Surg*. 2007; 25(5): 436-42.

Rodrigues, AF; Kondo,CA;Procópio,AFS; Luz,JGC: Helkimo and craniomandibular indices in theclassification of temporomandibular disorders. A comparative study, MYOPAIN. 2016.doi:10.1080/24708593.2016.1251999.

Sahbaie P, Shi X, Guo TZ, Qiao Y, Yeomans DC, Kingery WS, Clark JD. Role of substance P signaling in enhanced nociceptive sensitization and local cytokine production after incision. *Pain*. 2009;145(3):341-9. doi: 10.1016/j.pain.2009.06.037.

Sarlani E, Greenspan JD. Why look in the brain for answers to temporomandibular disorder pain? *Cells Tissues Organs*. 2005; 180(1): 69-75.

Satake H, Aoyama M, Sekiguchi T, Kawada T. Insight into molecular and functional diversity of tachykinins and their receptors. *Protein Pept Lett*. 2013 Jun;20(6):615-27

Sato J, Segami N, Kaneyama K, Yoshimura H, Fujimura K, Yoshitake Y. Relationship of calcitonin gene-related peptide in synovial tissues and temporomandibular joint pain in humans. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004 Nov;98(5):533-40.

Sato J, Segami N, Yoshitake Y, Kaneyama K, Abe A, Yoshimura H, Fujimura K. Expression of capsaicin receptor TRPV-1 in synovial tissues of patients with symptomatic internal derangement of the temporomandibular joint and joint pain. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2005 Dec;100(6):674-81.

Sato S, Goto S, Kamakura S, Motegi K. Morphologic changes in the elastic fibers of the temporomandibular joint after experimental disc perforation in the rabbit. *J Oral Maxillofac Surg*. 1998 Jun;56(6):753-8; discussion 758-9.

Sayed N, Murugavel C, Gnanam A. Management of Temporomandibular Disorders with Low Level Laser Therapy. *J Maxillofac Oral Surg.* 2014 Dec;13(4):444-50 doi: 10.1007/s12663-013-0544-1.

Sessle BJ. Acute and chronic craniofacial pain: brainstem mechanisms of nociceptive transmission and neuroplasticity, and their clinical correlates. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2000;11(1):57-91.

Shankland WE, 2nd. The trigeminal nerve. Part I: An over-view. *Cranio.* 2000;18(4):238-48.

Shamir MH, Rochkind S, Sandbank J, Alon M. Double-blind randomized study evaluating regeneration of the rat transected sciatic nerve after suturing and postoperative low-power laser treatment. *J Reconstr Microsurg.* 2001 Feb;17(2):133-7; discussion 8.

Snedecor GW, Sokal RR, Rohlf FJ. *Statistical methods Biometry.* New York: Owa State University Press; 1946.

Sun RQ, Tu YJ, Lawand NB, Yan JY, Lin Q, Willis WD. Calcitonin gene-related peptide receptor activation produces PKA- and PKC-dependent mechanical hyperalgesia and central sensitization. *J Neurophysiol.* 2004Nov;92(5):2859-66.

Svensson P, Arendt-Nielsen L, Nielsen H, Larsen JK. Effect of chronic and experimental jaw muscle pain on pain-pressure thresholds and stimulus-response curves. *J Orofac Pain.* 1995 Fall;9(4):347-56.

Sydney PBH, Conti PCR, Diretrizes para avaliação somatossensorial em pacientes portadores de disfunção temporomandibular e dor orofacial. *Rev Dor. São Paulo,* 2011 out-dez;12(4):349-53.

Takatsuka S, Narinobou M, Nakagawa K, Yamamoto E. Histologic evaluation of auricular cartilage grafts after discectomy in the rabbit craniomandibular joint. *J Oral Maxillofac Surg.* 1996 Oct;54(10):1216-25; discussion 1225-6.

Takeda M, Tanimoto T, Nasu M, Ikeda M, Kadoi J, Matsumoto S. Activation of NK1 receptor of trigeminal root ganglion via substance P paracrine mechanism contributes to the mechanical allodynia in the temporomandibular joint inflammation in rats. *Pain.* 2005Aug;116(3):375-85.

Tanaka E, Detamore MS, Mercuri LG. Degenerative disorders of the temporomandibular joint: etiology, diagnosis, and treatment. *J Dent Res.* 2008; 87(4):296-307.

Tarsa L, Balkowiec-Iskra E, Kratochvil FJ, 3rd, Jenkins VK, McLean A, Brown AL, Smith JA, Baumgartner JC, Balkowiec A. Tooth pulp inflammation increases brain-derived neurotrophic factor expression in rodent trigeminal ganglion neurons. *Neuroscience.* 2010; 167(4): 1205-15

Toledo LG, Cavalcanti SC, Correa L, Luz JG. Effects of injury or removal of the articular disc on maxillomandibular growth in young rats. *J Oral Maxillofac Surg.* 2014; 72(11): 2140-7. Doi: 10.1016/j.joms.2014.06.445.

Tominaga M. [Activation and regulation of nociceptive transient receptor potential (TRP) channels, TRPV1 and TRPA1]. *Yakugaku Zasshi.* 2010;130(3): 289-94. Japanese.

Usunoff KG, Marani E, Schoen JH. The trigeminal system in man. *Adv Anat Embryol Cell Biol.* 1997;136: I-X, 1-126.

Von Korff M, Galer BS, Stang P. Chronic use of symptomatic headache medications. *Pain.* 1995 Aug;62(2):179-86.

Waite PM, Ashwell, K. W. Trigeminal sensory system. In: Paxinos, G. *The human nervous system.* Amsterdam: Elsevier; 2004.

Walker KM, Urban L, Medhurst SJ, Patel S, Panesar M, Fox AJ, McIntyre P. The VR1 antagonist capsaizepine reverses mechanical hyperalgesia in models of inflammatory and neuropathic pain. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003Jan; 304(1):56-62.

Yu Y, Lundeberg T, Yu LC. Role of calcitonin gene-related peptide and its antagonist on the evoked discharge frequency of wide dynamic range neurons in the dorsal horn of the spinal cord in rats. *Regul Pept.* 2002Jan;103(1):23-7.

Zhang H, Cang CL, Kawasaki Y, Liang LL, Zhang YQ, Ji RR, Zhao ZQ. Neurokinin-1 receptor enhances TRPV1 activity in primary sensory neurons via PKCepsilon: a novel pathway for heat hyperalgesia. *J Neurosci.* 2007Oct;27(44): 12067-77.

ANEXOS

ANEXO A- Parecer do comitê de ética em pesquisa animal da FOU SP

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
Tel. (11) 3091 7840-202

Certificado

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **006/2015** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof. Dr. **João Gualberto de Cerqueira Luz**, Coordenador da Linha de Pesquisa "Efeitos da laserterapia no comportamento nociceptivo e na atividade neuronal do núcleo trigeminal após lesão do disco da articulação temporomandibular em ratos" do qual participam o(s) pesquisador(es) **Marucia Chacur, Alex de Freitas Rodrigues, Daniel de Oliveira Martins e Rosalia Regina De Luca**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **23/02/2015**, com validade de **03 (três) anos**.

São Paulo, 25 de fevereiro de 2015.

Prof. Dr. Victor Elias Arana-Chavez
Coordenador do CEUA-FOUSP



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Línea Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone: (55) (011) 3091.7733 – e-mail: icb@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **037** nas fls.31 do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Marucia Chacur**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Efeitos da laserterapia no comportamento nociceptivo e na expressão da atividade neuronal no núcleo trigeminal após lesão do disco da articulação temporomandibular, em ratos*" do qual participam o(s) aluno(s) **Daniel Martins, Alex de Freitas Rodrigues**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) em **30.03.2015**, com validade de **4 anos**.

São Paulo, 06 de abril de 2015.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador- CEUA- ICB/USP

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

