

ALEX DE FREITAS RODRIGUES

**Efeitos da fotobiomodulação na atividade de nociceptores e na expressão de
citocinas pró-inflamatórias após lesão do disco da articulação
temporomandibular em ratos**

São Paulo

2022

ALEX DE FREITAS RODRIGUES

Efeitos da fotobiomodulação na atividade de nociceptores e na expressão de citocinas pró-inflamatórias após lesão do disco da articulação temporomandibular em ratos

Versão Corrigida

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

Área de concentração: Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofaciais

Orientador: Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz

São Paulo

2022

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

Rodrigues, Alex de Freitas.

Efeitos da fotobiomodulação na atividade de nociceptores e na expressão de citocinas pró-inflamatórias após lesão do disco da articulação temporomandibular em ratos / Alex de Freitas Rodrigues; orientador João Gualberto de Cerqueira Luz. -- São Paulo, 2022.

105 p. : fig. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- 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 de baixa intensidade. 5. Citocinas pró-inflamatórias.. I. Luz, João Gualberto de Cerqueira. II. Título.

Rodrigues AF. Efeitos da fotobiomodulação na atividade de nociceptores e na expressão de citocinas pró-inflamatórias após lesão do disco da articulação temporomandibular em ratos. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: 25/10/2022

Banca Examinadora

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

Instituição: ICB/USP

Julgamento: APROVADO

Prof(a). Dr(a). Luciana Correa

Instituição: FOUSP

Julgamento: APROVADO

Prof(a). Dr(a). Samantha Cristine Santos Xisto Braga Cavalcanti

Instituição: Faculdade Metropolitana Unidas - FMU

Julgamento: APROVADO

Dedico este trabalho ao meu pai Aparecido Rodrigues (In memoriam) e a minha tia Tarsila Francisca Ricardo (In memoriam) 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.

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

A Profa Dra. Luciana Correa, pela participação no trabalho, por nos ajudar nas análises histológicas e histomorfométrico e disponibilizar toda a estrutura do Laboratório de Patologia I-USP, indispensáveis na realização deste trabalho.

A 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.

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

Ao Prof.Dr. Daniel de Oliveira Martins, pela amizade, pelo carinho, por compartilhar comigo os momentos mais difíceis na realização desse 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 Antônio S. Correa, Prof.Dr. Antônio Silva F. Procopio, Profa.Dra. Marina Palo Prado, Prof.Dr. Antonio Carlos de Campos, Prof.Dr. Marcos Vianna Gayotto (In Memoriam), Prof.Dr. Reinaldo Brito e Dias, pela inspiração e carinho ao longo desses anos.

Aos amigos da pós-graduação: Rubens Camino Junior, Vitor Pereira Rodrigues, Ricardo Pimenta D'Avila, Samantha S.B. Cavalcanti pela ajuda e companhia durante esta etapa e pela frutífera convivência durante toda esta jornada.

Aos funcionários Edison Vicente e Maria Aparecida Conceição, em nome do qual eu agradeço a todos os funcionários da FOU SP, do ICB 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.

A Primeira Igreja Presbiteriana Independente de São Paulo, Fundação Mary Harriet Speers, Rev. Abival Pires da Silveira (In Memoriam), por todo o amor e suporte ao longo dessa trajetória.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”.

"Sua visão se tornará clara somente quando você olhar para dentro do seu coração. Quem olha para fora, sonha. Quem olha para dentro, desperta."

Carl Jung

RESUMO

Rodrigues AF. Efeitos da fotobiomodulação na atividade de nociceptores e na expressão de citocinas pró-inflamatórias após lesão do disco da articulação temporomandibular em ratos [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2022. Versão Corrigida.

A dor na articulação temporomandibular (ATM) é comum na clínica, na forma de artralgia. Geralmente, é devido a distúrbios do disco articular, deslocamentos ou trauma. Nosso objetivo foi analisar os efeitos da fotobiomodulação (PBM) na atividade nociceptora e na expressão de substâncias pró-inflamatórias no disco da ATM após lesão unilateral em ratos. Foi realizada lesão no disco após acesso cirúrgico na ATM sob anestesia geral. 40 ratos foram divididos em 4 grupos (n = 10 cada): Grupo Op + PBM: Lesão cirúrgica do disco articular e PBM; Grupo SHAM: Falso operado +PBM; Grupo Op: lesão cirúrgica do disco articular; Grupo Naive: controle. Dez sessões foram realizadas com laser GaAs com comprimento de onda de 904 nm e densidade de energia 6J / cm². Uma parte das amostras contendo tecidos moles articulares foram preparadas para determinação do conteúdo protéico por espectrofotometria da substância P (SP), receptor do potencial transiente vaniloide do subtipo-1 (TRPV-1) e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), Interleucina 6 (IL-6), Interleucina 1 beta (IL1-β) e Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF-α). Foi realizada análise de variância de duas vias com pós-teste de Tukey (p <0,050). Outra parte foi utilizada para análise histológica e histomorfométrica. Houve aumento da expressão das substâncias avaliadas após lesão e uma diminuição significativa após PBM, quando comparado com os demais grupos. A análise histológica e histomorfométrica mostrou reparação com melhor organização tecidual no grupo Op + PBM. O uso da PBM é eficaz na modulação da atividade nociceptora e nas expressões das citocinas pró-inflamatórias na ATM.

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

ABSTRACT

Rodrigues AF. Effects of Photobiomodulation on nociceptive activity and in the expression of inflammatory cytokines after injury of the Temporomandibular Joint disc after in rats [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2022. Versão Corrigida.

Pain in the temporomandibular joint (TMJ) is common in the clinic, in the form of arthralgia. It is usually due to joint disc disorders, dislocations, or trauma. Our objective was to analyze the effects of photobiomodulation (PBM) on nociceptor activity and on the expression of pro-inflammatory substances in the TMJ disc after unilateral injury in rats. Disc injury was performed after surgical access to the TMJ under general anesthesia. 40 rats were divided into 4 groups (n = 10 each): Group Op + PBM: Surgical lesion of the articular disc and PBM; SHAM group: False operated +PBM; Group Op: surgical lesion of the articular disk; Naive group: control. Ten sessions were performed with a GaAs laser with a wavelength of 904 nm and an energy density of 6J/cm². A portion of the samples containing joint soft tissues were prepared for determination of protein content by spectrophotometry of substance P (SP), receptor transient vanilloid potential subtype-1 (TRPV-1) and calcitonin gene-related peptide (CGRP), Interleukin 6 (IL-6), Interleukin 1 beta (IL1- β) and Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- α). Two-way analysis of variance with Tukey's post-test (p<0.050) was performed. Another part was used for histological and histomorphometric analysis. There was an increase in the expression of the evaluated substances after injury and a significant decrease after PBM, when compared to the other groups. Histological and histomorphometric analysis showed repair with better tissue organization in the Op + PBM group the use of PBM is effective in modulating nociceptor activity and expressions of pro-inflammatory cytokines in the TMJ.

Keywords: Nociception. Temporomandibular Joint. Temporomandibular joint disc. Low- level light therapy. Cytokines.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 2.1 - Ilustração do teste de estimulação tátil – Filamentos de Von Frey41
- Figura 2.2 - Efeito da aplicação do laser de baixa intensidade sobre a resposta nociceptiva nos ratos com lesão do disco articular42
- 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 **E** vemos a sutura do plano muscular em **F** vemos a sutura da pele47
- Figura 4.2 - Esquema dos pontos de aplicação do laser. Vemos os pontos de aplicação. Ponto central, ponto superior, ponto inferior, ponto a direita e a esquerda. Todos os pontos com uma distância de 1 cm do ponto central48
- Figura 4.3 - Esquema do modo de contenção manual do animal para aplicação do laser. Vemos a contenção com a mão esquerda e a aplicação do laser..49
- Figura 4.4 - Esquema do protocolo de aplicação. Vemos a distância do aparelho em relação aos animais sob tratamento (1 cm)49
- Quadro 4.1 - Principais parâmetros do laser como parâmetros sobre feixe de luz, dose utilizada e técnica de aplicação50
- Quadro 4.2 - Anticorpos utilizados nos experimentos de *immunoblotting* e suas respectivas concentrações53
- Figura 5.1 - Efeito do tratamento com laser sobre a expressão de Substância P no disco articular56

Figura 5.2 - Efeito da laserterapia sobre a expressão de TRPV-1 no disco articular..	57
Figura 5.3 - Efeito do tratamento com laser sobre a expressão de CGRP no disco articular	58
Figura 5.4 - Efeito do tratamento com laser sobre a expressão de IL1- β no disco articular	60
Figura 5.5 - Efeito do tratamento com laser sobre a expressão de IL-6 no disco articular	61
Figura 5.6 - Efeito do tratamento com laser sobre a expressão de TNF- α no disco articular	62
Figura 5.7 - (grupo Naive): Cortes histológicos representativos da região da articulação temporomandibular no grupo Naive. A: Visão sagital da região do côndilo mandibular, com presença do disco articular (d) delimitando os espaços articulares superior (us) e inferior (ls). ap: porção anterior. pp: porção posterior (Hematoxilina-eosina, aumento original de 50x). B: Detalhe da interface do disco (d) próxima da superfície condilar (c), exibindo tecido conjuntivo denso com ausência de vascularização nessa região. ls – espaço articular inferior (Hematoxilina-eosina, aumento original de 400x). C: Situação de disco articular com estreitamento se estendendo para a porção posterior, com morfologia mais irregular da cabeça do côndilo (Hematoxilina-eosina, aumento original de 50x). D: Detalhe da interface do disco (d) próxima da superfície condilar (c), exibindo células semelhantes a condroblastos (setas) (Hematoxilina-eosina, aumento original de 400x)	64
Figura 5.8 - Cortes histológicos representativos do grupo SHAM+PBM. A: Aspecto normal da articulação temporomandibular, com ligeiro estreitamento aumentado do disco articular (Hematoxilina-eosina, aumento original de 50X). B: Em dois animais, o disco articular exibiu espessamento e a cabeça do côndilo, alteração da morfologia, aspectos provavelmente oriundos do posicionamento condilar no momento da eutanásia ou do nível de aprofundamento do corte	65

Figura 5.9 - (grupo Operado) Cortes histológicos representativos do grupo Operado. **A:** Articulação temporomandibular exibindo espessamento do disco articular, com preservação da anatomia do côndilo (Hematoxilina-eosina, aumento original de 50x). **B:** Detalhe da porção anterior do disco, no qual se observa inserção das fibras musculares e intensa atividade osteoclástica na porção medial do côndilo (setas). **C:** Outra situação na qual o disco articular fusionou com as fibras musculares, perdendo sua morfologia original e alterando a área do espaço articular inferior. A anatomia do côndilo está alterada, sem o correto posicionamento da cabeça condilar e hiperplasia da camada de cartilagem proliferativa e hialina. **D:** Detalhe do disco articular exibindo tecido conjuntivo menos denso, com grande quantidade de fibras musculares interpostas e aberturas vasculares com luzes amplas e parede delgada, sugerindo vascularização linfática66

Figura 5.10 - (Grupo Operado+Irradiado) Cortes histológicos representativos do grupo Operado+Irradiado. **A:** Aspecto da articulação temporomandibular exibindo hiperplasia do disco articular, com espessamento homogêneo de toda a extensão do disco e alteração da morfologia da cabeça do côndilo. O posicionamento do côndilo em relação à fossa temporal está compatível com a normalidade, assim como a inserção do disco nas porções anterior e posterior (Hematoxilina-eosina, aumento original de 50x). **B:** Detalhe da disco articular, com a presença de tecido conjuntivo bem denso e celularizado, exibindo grande quantidade de vasos com luz reduzida e parede espessa, compatíveis com capilares e arteríolas (□) (Hematoxilina-eosina, aumento original de 400x). **C:** Outra situação observada nesse grupo, com presença de hiperplasia do disco e morfologia preservada do côndilo (Hematoxilina-eosina, aumento original de 50x). **D:** Detalhe da porção posterior do disco, que exibe ampla inserção na região cervical do côndilo e maior nitidez da cápsula articular (Hematoxilina-eosina, aumento original de 400x).....68

Figura 5.11 - Análise quantitativa espaço articular inferior. (A) Área do espaço articular inferior69

Figura 5.12 - Análise quantitativa espaço articular inferior, (B) perímetro do espaço articular inferior70

Figura 5.13 - Análise quantitativa do espaço articular superior. (A) do espaço articular superior71

Figura 5.14 - Análise quantitativa do espaço articular superior. (B) Perímetro do espaço articular superior 72

Figura 5.15 - Análise quantitativa do disco articular. (A) Área do disco articular 73

Figura 5.16 - Análise quantitativa do disco articular. (B) Perímetro do disco articular 74

Figura 5.17 - Análise quantitativa do disco articular. (C) Fator de forma do disco articular 75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATM	Articulação Temporomandibular
CFA	Composto Adjuvante de Freund
CGRP	gene-relacionado ao peptídeo calcitonina
DRG	Gânglio da raiz dorsal
DTM	Disfunção Temporomandibular
GaAs	Laser arseneto de gálio
GT	Gânglio trigeminal
IL1- β	Interleucina 1beta
IL-6	Interleucina 6
LLLT	Terapia com laser de baixa intensidade
NET	Nucleo espinal do trigêmeo
NK-1	Receptor neuroquinina tipo 1
PBMT	Terapia de Fotobiomodulação
SP	Substância P
TRPV-1	Receptor do potencial transiente vanilóide- subtipo 1
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
VAS	Escala visual analógica de dor

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1	ANATOMIA.....	25
2.2	DOR INTRARTICULAR E DISCO ARTICULAR.....	27
2.3	O MODELO DA LESÃO DO DISCO ARTICULAR DA ATM.....	29
2.4	TRANSMISSÃO NOCICEPTIVA DA REGIÃO OROFACIAL.....	30
2.5	MEDIADORES QUÍMICOS DA DOR	32
2.6	CITOCINAS INFLAMATÓRIAS E SUA RELAÇÃO COM A DOR.....	34
2.7	FOTOBIMODULAÇÃO	36
2.8	COMPORTAMENTO NOCICEPTIVO	39
3	PROPOSIÇÃO	43
4	MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1	PROCEDIMENTO CIRÚRGICO.....	45
4.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E APLICAÇÃO DO LASER PÓS-LESÃO.....	48
4.3	ANTICORPOS UTILIZADOS	51
4.4	IMMUNOBLOTTING.....	51
4.5	ANÁLISE DOS RESULTADOS	52
4.6	ANÁLISE HISTOLÓGICA NOS DIFERENTES GRUPOS	54
4.7	ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA NOS DIFERENTES GRUPOS	54
5	RESULTADOS	55
5.1	EXPRESSÃO DA ATIVIDADE NOCICEPTORA	55
5.1.1	Efeito sobre a expressão de SP	55
5.1.2	Efeito sobre a expressão do TRPV-1	56
5.1.3	Efeito sobre a expressão de CGRP	58
5.2	EFEITOS SOBRE A EXPRESSÃO DAS CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS.....	59

5.2.1	Efeitos sobre a expressão de IL1 β	59
5.2.2	Efeito sobre a expressão de IL-6	60
5.2.3	Efeitos sobre a expressão de TNF- α	62
5.3	ANÁLISE HISTOLÓGICA NOS DIFERENTES GRUPOS	63
5.3.1	Naive	63
5.3.2	Falso-Operado (SHAM + PBM).....	65
5.3.3	Operado	65
5.3.4	Operado+Irradiado	67
5.4	ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA NOS DIFERENTES GRUPOS ..	69
5.4.1	Área do Espaço Articular Inferior	69
5.4.2	Perímetro do Espaço Articular Inferior	70
5.4.3	Área do Espaço Articular Superior	71
5.4.4	Perímetro do Espaço Articular Superior	71
5.4.5	Área do Disco Articular	72
5.4.6	Perímetro do Disco Articular	73
5.4.7	Fator de Forma do Disco Articular	74
6	DISCUSSÃO.....	77
7	CONCLUSÕES.....	85
	REFERÊNCIAS	87
	ANEXOS.....	103

1 INTRODUÇÃO

Dor é uma experiência sensorial e emocional desagradável associada ou semelhante àquela associada a dano real ou potencial ao tecido (Raja et al., 2020). A dor patológica é caracterizada por um baixo limiar e uma resposta exagerada a estímulos nocivos, e pode ser categorizada como dor oncológica, dor neuropática ou inflamatória. Embora a dor fisiológica seja essencial para a eliminação de estímulos prejudiciais, a dor patológica significativamente afeta a qualidade de vida. Apesar do crescente conhecimento dos mecanismos de dor patológica, este tipo de dor ainda representa um importante desafio na prática clínica e ciência básica (Zhou et al., 2016).

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 variam em relação ao grau de intensidade 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, uma lista ordenada que apresenta os sinais e sintomas, os achados clínicos e demais desfechos importantes, permite uma quantificação confiável dos sinais e sintomas para auxiliar no diagnóstico dessas disfunções (Rodrigues et al., 2016). 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.

O tratamento das disfunções intra-articulares da ATM inclui o uso de placas interoclusais, fisioterapia, estímulos elétricos, medicamentoso, artrocenteses, artroscopias, porém existem situações de difícil controle que necessitam outras 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 fotobiomodulação (PBMT) através do uso da laserterapia de baixa intensidade (LLLT) representa uma modalidade de tratamento importante para o controle da dor nesses casos, seja no seu uso isolado, ou como coadjuvante a outras modalidades de tratamento. A PBM é um tratamento não invasivo, e de fácil aplicação. Seus efeitos clínicos esperados são analgesia, modulação da inflamação e 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 PBM no tratamento da dor orofacial e seus efeitos bioestimuladores, mas pouco se sabe sobre o efeito dessa modalidade de tratamento especificamente na dor intra-articular. Desta forma torna-se importante avaliar seus efeitos na atividade nociceptiva e na expressão das citocinas pró-inflamatórias no disco articular, o que pode contribuir para o melhor tratamento dos pacientes com essa problemática.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Esta revisão da literatura foi feita por meio de um levantamento de 20 anos sobre os temas relacionados. Porém, alguns artigos de épocas anteriores quando necessários e relevantes foram incluídos. A presente revisão foi feita considerando os seguintes aspectos: anatomia da ATM, dor articular e do disco, modelo da lesão articular, transmissão nociceptiva na região orofacial, mediadores químicos da dor, citocinas pró-inflamatórias e sua relação com a dor e fotobiomodulação.

2.1 ANATOMIA

A ATM consiste no processo condilar do ramo mandibular, a fossa mandibular do osso temporal, um disco articular delgado e uma cápsula articular frouxa, que é reforçada por um ligamento lateral fibroso. As ATMs são únicas por terem um movimento controlado não apenas pela morfologia da articulação em si, mas também pela denteção na outra extremidade do sistema de alavanca. Durante a vida, as superfícies articulares temporal, condilar e discal sofrem remodelação. 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, produzido pela camada interna da capsula articular. A sinóvia é um importante componente articular que contribui para nutrir e lubrificar as superfícies avasculares e possui propriedades bactericidas. Está distribuída em 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 tem um coeficiente de fricção muito baixo e compensa a falta de congruência entre as superfícies articulares. Biomecanicamente, é estabilizado entre o côndilo e a eminência articular por sua borda espessa que possui propriedades viscoelásticas especiais (Piette, 1993). 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 consistem 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. No sentido anterior e posterior a capsula é frouxa, o que permite o movimento mandibular. A ATM é amparada por dois ligamentos acessórios (esfenomandibular e estilomandibular) que a protegem quando da realização de movimentos extremos. 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 esenoide 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 vascularização é realizada pelos ramos terminais da carótida externa: artérias maxilares 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 neurosensoriais, 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 estão 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 (Ogus;Toller, 1981; Cascone et al., 1987; Mohl, 1989). 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 INTRARTICULAR E DISCO ARTICULAR

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 (Raja et al., 2020), 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. Através de um estudo clínico randomizado para avaliação de tratamentos não cirúrgicos de deslocamento anterior de disco da ATM (Minakuchi et al., 2001) observou através desse estudo transversal 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 uma revisão da literatura das DTMs (Merrill, 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.

As inflamações dos tecidos retrodiscais abrangem um grupo de alterações nas quais vários tecidos que compõem a estrutura articular sofrem um processo inflamatório, sendo classificadas segundo as estruturas afetadas em: sinovite, capsulite, retrodiscite, ligamentite e artrites (Okeson, 2013; Valle et al., 2015). Geralmente, é difícil realizar o diagnóstico diferencial entre essas alterações artrogênicas que ocorre em virtude de suas semelhanças clínicas. A inflamação da membrana sinovial que reveste a ATM (sinovite), resulta em alterações da composição e quantidade do fluído sinovial (Israel, 2016). Clinicamente, caracteriza-se por uma dor intracapsular constante que se intensifica com o movimento mandibular (Okeson, 2013). Quando intensa, pode ocorrer necrose e deposição de fibrina nas superfícies articulares que reduz o espaço articular e eventualmente pode levar a uma anquilose fibrótica da ATM (de Bont et al., 1997). A inflamação do ligamento capsular da ATM (capsulite), manifesta-se clinicamente por uma dor à palpação do pólo lateral da cabeça da mandíbula quando essa se encontra em posição articular estática e em movimento. O fator etiológico mais frequente é o

macrotrauma, nos casos em que o ligamento capsular é bruscamente alongado (Okeson, 2013; Valle et al., 2015). Durante o processo de cicatrização, a cápsula articular pode aderir às estruturas adjacentes (capsulite adesiva) ou cicatrizar com perda de comprimento (fibrose capsular) (de Bont et al., 1997). A inflamação dos tecidos retrodiscais da ATM (retrodiscite) é caracterizada por uma dor pulsátil que pode levar à má oclusão aguda na região anterior contralateral da mandíbula, devido ao edema local. Macro e microtraumas que forcem a cabeça da mandíbula em direção aos tecidos retrodiscais, inervados e vascularizados, podem originar a retrodiscite (Okeson, 2013). A intensidade do trauma e a progressão do processo inflamatório podem ocasionar a perfuração dos tecidos retro discais e posicionar a cabeça da mandíbula em contato direto com a fossa mandibular (de Bont et al., 1997). A inflamação dos ligamentos do disco (ligamentite) decorre a partir de macro ou micro traumas, bruxismo e/ou atos funcionais de ampla magnitude que tentam deslocar o disco da cabeça da mandíbula, usualmente resulta em dor de caráter intermitente, aumentando pela máxima intercuspidação e reduzindo-se pela interposição dentária de uma espátula. Pode-se encontrar associada ao quadro álgico, contração muscular protetora e limitação dos movimentos mandibulares (Okeson, 2013). A inflamação das superfícies articulares (artrites) constitui um grupo de desordens em que se observam alterações na morfologia do tecido ósseo. Vários tipos de artrites podem afetar a ATM (osteoartrite, osteoartrose e poliartrites), sendo o nível de dor e os achados clínicos e de imagem extremamente variáveis nos seus diferentes tipos (Polunha; Grossmann, 2018).

2.3 O MODELO DA LESÃO DO DISCO ARTICULAR DA ATM

Do ponto de vista experimental existe uma dificuldade em se conseguir mimetizar os aspectos relacionados aos desarranjos internos da ATM, relacionados com os deslocamentos do disco em relação aos componentes ósseos. Muitos modelos experimentais existem, como pela injeção de substâncias flogísticas como formalina (Goulart et al., 2005; Barreto et al., 2013), carragenina (Goulart et al., 2005; Carvalho et al., 2011; Barreto 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 tem 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), ou a utilização de placa para cruzamento da oclusão (Zhang et al., 2018). 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. Luz et al. (1991) avaliaram os efeitos do trauma indireto à ATM de ratos e verificaram, nas fases iniciais, laceração do disco articular e processo inflamatório agudo, seguidos por regressão do processo inflamatório, ocorrendo redução do espaço articular. Demonstraram a capacidade de remodelamento da ATM. Ali e Sharawi (1994) estudaram a relação entre o deslocamento cirúrgico experimental do disco em coelhos e suas mudanças histopatológicas e encontraram no processo inicial do reparo neoformação vascular e áreas de fibrilação. Cooper et al. (1999) observaram em seu trabalho experimental em cabras o efeito do trauma nos tecidos retrodiscais, tendo ocorrido alterações na expressão de colágeno e consequente fragilização na resistência desse tecido.

2.4 TRANSMISSÃO NOCICEPTIVA DA REGIÃO OROFACIAL

As informações sensoriais da maioria dos tecidos craniofaciais, incluindo as meninges, articulação temporomandibular e dentes, incluindo as relacionadas com dor crônica, como como enxaquecas, dores de cabeça recorrentes, disfunções temporomandibulares e neuralgias do trigêmeo são mediadas por vias nociceptivas trigeminais (Pietrobon; Striessnig, 2003; Prasad; Galetta, 2009) com os neurônios de primeira ordem no gânglio trigêmeo (GT) (Shankland, 2000). As Fibras sensoriais primárias que inervam a região orofacial derivam de neurônios do GT, na 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 de condução lenta. 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 a nível central (Fan et al., 2011). A partir da porção sensitiva do complexo trigeminal, as sensações álgicas, térmicas e proprioceptivas são veiculadas através de vias neurais específicas até o tálamo, de modo análogo ao que ocorre com as informações sensoriais, captadas e em outros tecidos periféricos e transmitidas a partir da medula espinal (Waite; Ashweel, 2004).

Na ATM, das fibras aferentes com neurotransmissores se encontram de porção anterior da cápsula articular e do disco, seguida pelas porções posterior, lateral e medial. Foi observado que muitos nervos contendo os neurotransmissores SP- e CGRP terminaram na camada sub-sinovial, mas alguns ramos se estendiam para a camada de revestimento sinovial superficial perto da cavidade articular. Os nervos imunomarcados estavam localizados de maneira proeminente na inserção do disco e na porção periférica do disco, e nervos ocasionais estavam localizados na densa faixa de colágeno do disco como um disco real. No entanto, nenhuma fibra foi detectada na banda central do disco. Assim, a maior parte do disco não foi inervada por nenhum nervo (Kido et al., 1993).

2.5 MEDIADORES QUIMICOS DA DOR

Após lesão tecidual, uma resposta inflamatória é gerada por macrófagos locais e isso é ainda mais amplificado pela migração das células sanguíneas. Os vários inflamatórios mediadores que são liberados, bem como a acidificação do tecido agem sinergicamente para induzir e manter o desenvolvimento da dor e hiperalgesia (Sommer et al., 2004), causado pela redução do limiar nociceptivo e pelo aumento da excitabilidade dos aferentes primários. Isto ocorre porque a lesão tecidual promove a liberação de diferentes substâncias bem como leva a ativação de receptores que contribuem para este 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 na inflamação (Amaya et al., 2003), e dor neuropática (Hudson et al., 2001; Fukuoka et al., 2002; Rashid et al., 2003). Na dor orofacial, TRPV-1 é relatado por estar envolvido na inflamação da polpa dentária (Chidiac et al., 2002; Tarsa et al., 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) (Martins et al., 2017). 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; Breese et al., 2005; Kanai 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 imunohistoquímica ja demonstram que a SP e receptor NK-1 são colocalizados com

TRPV-1 em neurônios do gânglio da raiz dorsal ou do trigêmeo (Bae et al., 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, o comportamento de coçar, morder e lamber, indicando nociceção, e sugerindo que a SP possa ter papel estimulatório importante na via nociceptiva.

A substância P (SP) é um neurotransmissor neuropeptídeo composto por uma cadeia de 11 resíduos de aminoácidos que atua como neuromodulador. A substância P facilita processos inflamatórios, vômito, ansiedade e nociceção. 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), e degradada por endopeptidases neutras. A SP desempenha as seguintes funções, dependendo do receptor: resposta de dor na medula espinhal, regulação da resposta emética, regeneração de tecido epitelial, regeneração de tecido nervoso, sendo que a SP aumenta a atividade do glutamato no sistema nervoso central, sendo assim está 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 grandemente aumentada após inflamação orofacial (Neubert et al., 2000). Estes dados sugerem fortemente que a SP periférica desempenha um papel no processo nociceptivo trigeminal (Awawdeh et al., 2002; Bowles et al., 2003; Caviedes-Bucheli et al., 2006). 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 caminho da dor trigeminal, tanto a nível periférico quanto central (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 (Yu et al., 2002; Sun et al., 2004; Bird et al., 2006). 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., 2005).

2.6 CITOCINAS INFLAMATÓRIAS E SUA RELAÇÃO COM A DOR

As disfunções de caráter inflamatório da ATM podem ocorrer a partir de um trauma ou de uma sobrecarga intrínseca e/ou extrínseca articular, que excede a capacidade adaptativa dos tecidos articulares, gerando como consequência o processo inflamatório. Este processo compreende um conjunto de fenômenos homeostáticos dos tecidos vascularizados no sentido de remoção de agentes lesivos e restauro de suas funções normais, sendo esses fenômenos coordenados pela ação de mediadores inflamatórios. A dor e o sistema imunológico influenciam-se mutuamente, o que torna difícil determinar se o bloqueio da nocicepção contribui para a redução da produção de citocinas pró-inflamatórias, ou vice-versa, com a redução da formação de citocinas pró-inflamatórias resultando em dor menos intensa (Martins et al., 2013). A histamina, a serotonina, as cininas, os eicosanoides, o fator de ativação plaquetária, o óxido nítrico, o fator de necrose tumoral e as

interleucinas, estão entre os principais MI das disfunções da ATM (Ernberg, 2017; Wiekcievycz, 2018). Portanto, o conhecimento sobre esses MI pode contribuir para melhor entendimento das desordens, bem como para seleção de terapêuticas adequadas, como a farmacologia anti-inflamatória, as infiltrações intra-articulares, a artrocentese e a artroscopia a fim de otimizar os resultados clínicos (Hosgor, 2019).

Oliveira et al. (2011) observaram em sua revisão de literatura que as citocinas são substâncias necessárias para a resposta inflamatória, favorecendo a cicatrização apropriada da ferida. No entanto, a produção exagerada de citocinas pró-inflamatórias a partir da lesão pode manifestar-se sistemicamente com instabilidade hemodinâmica ou distúrbios metabólicos.

Bouloux (2018) ao analisar os componentes presentes no fluido sinovial das Atms em pacientes com diferentes patologias observou que as condições patológicas intra-articulares estão associadas a mudanças qualitativas e quantitativas em vários biomarcadores do líquido sinovial. Os biomarcadores identificados em qualquer paciente podem possibilitar um diagnóstico específico, incluindo desarranjo interno, sinovite, condromalácia e artrite autoimune. Biomarcadores podem ser usados para monitorar a progressão da doença e a resposta ao tratamento.

Citocina é o nome de um grupo de substâncias que quando secretada por células inflamatórias agem como fatores extracelulares, afetando o comportamento das células vizinhas portadoras de receptores adequados (Murphy, 2015), gerando ativação, sinalização, divisão ou formação de novos receptores (Tizard, 2009).

As citocinas são produzidas por células do sistema imune, como os linfócitos, macrófagos, monócitos e leucócitos. As variadas citocinas podem ser enquadradas em diversas categorias: As interleucinas (IL), caracterizando-se por mediar a sinalização entre linfócitos e os outros leucócitos; Os Fatores de Necrose Tumoral (TNF) um grupo de citocinas capaz de provocar a morte de células (apoptose) tumorais e que possuem uma vasta gama de ações pró-inflamatórias. O TNF- α é secretado principalmente por macrófagos e mastócitos, atuando como principal mediador da inflamação aguda e criando efeitos citotóxicos nas células tumorais (Batista, 2020).

A interleucina 1 beta é um dos membros de uma grande família gênica chamada de *IL1*. A *IL1b* é uma das mais importantes citocinas pró-inflamatórias, junto com outras moléculas de atividade semelhante, como o fator de necrose tumoral alpha (*Tnf*), a interleucina 6 (*IL6*) a interleucina 8 (*IL8*), podem induzir a inflamação aguda (cascata de citocinas, febre alta, produção de proteína C reativa), em resposta à infecções ou danos no tecido. No tecido periférico estimula a síntese de Prostaglandinas (*PGs*), especialmente, da Prostaglandina-E2 (*PGE2*), que leva a sensibilização dos nociceptores aferentes primários induzindo a hiperalgesia inflamatória (Pascoal, 2010).

TNF α é um mediador inflamatório produzido pelo sistema imunológico ativado células, glia e neurônios (Gregersen et al., 2000; Xu et al., 2006) Sendo uma citocina pró-inflamatória, desempenha um papel importante no desenvolvimento da dor crônica (Ren; Dubner, 2010; Calvo et al., 2012). No entanto, não está claro se o *TNF α* no sistema nociceptivo trigeminal contribui para o desenvolvimento de dor na ATM. Embora estes estudos anteriores sugiram que a suprarregulação de *TNF α* nos tecidos periféricos está envolvida na patogênese da inflamação e dor, a administração sistêmica de um anticorpo monoclonal para *TNF α* alivia parcialmente a dor na ATM mediada pela força de mordida (Kim et al., 2015), ainda é incerto se o bloqueio da expressão de *TNF α* pode inibir a inflamação e dor na ATM (Bae et al., 2004).

IL-6 é uma citocina inflamatória com ampla variação biológica de efeitos. Foi descrito pela primeira vez como fator Beta estimulador, que induz os linfócitos B a produzir imunoglobulina (Zhou et al., 2016).

2.7 FOTOBIMODULAÇÃO

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 fotobiomodulação se refere à aplicação de luz a um sistema biológico capaz de induzir um processo fotoquímico, principalmente nas mitocôndrias, com estimulação da produção de energia em forma de adenosina trifosfato (ATP)², o que pode aumentar o metabolismo celular e produzir efeitos como analgesia³, regeneração de tecidos e cicatrização de feridas⁴, redução de fadiga muscular⁵, dentre outros (Bacelete; Gama, 2021).

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 / cm², 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°C (Ribeiro; Zezell, 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-se que o uso do LLLT na ATM promoveu um efeito analgésico moderado e que os parâmetros ótimos de LLLT no tratamento da dor não estão 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-se 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 660 nm 4 J / cm² nas articulações temporomandibulares com parâmetros e 796 nm 8 J / cm² nos músculos em três sessões (Pereira et al., 2014) observou-se 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-se 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

necessariamente 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 (Martins et al., 2013) observou-se 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 de irradiação de LLLT na proliferação celular (Moore et al., 2005) observou-se que os fibroblastos proliferaram mais rapidamente do que as células endoteliais em resposta à irradiação com laser. A proliferação celular máxima ocorreu com luz 665 e 675 nm, enquanto que luz 810 nm foi inibitória para fibroblastos.

2.8 COMPORTAMENTO NOCICEPTIVO

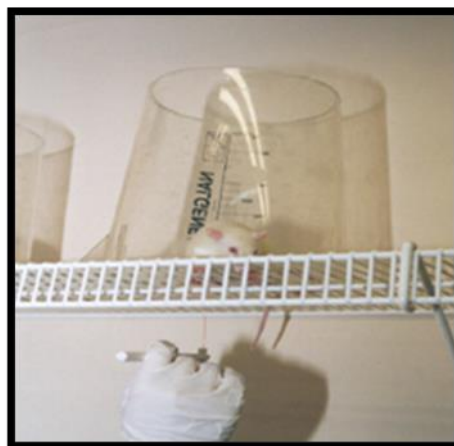
Diversos são os testes que avaliam a ação de drogas ou outras modalidades de tratamento sobre comportamentos indicativos de nocicepção manifesta, nos quais o estímulo utilizado causa, por si só, a ativação das vias nociceptivas, induzindo o comportamento compatível com dor. Ainda existem testes nos quais são avaliados parâmetros que indiquem a presença de fenômenos como a hipernocicepção ou alodinia, ou seja, nos quais ocorre diminuição do limiar de tolerância à estimulação de caráter mecânico, térmico ou químico. Ao do protocolo de laserterapia. A presença e extensão de comportamentos aversivos nas respostas a estímulos mecânicos são geralmente determinadas usando o teste de Von Frey. Os modelos experimentais baseados em testes mecânicos permitem a avaliação do aumento da sensibilidade do nociceptor a estímulos inofensivos (alodinia) ou nocivos (hiperalgesia). Porém, além de estímulo de nociceptores de fibras A δ e nociceptores de fibras C, também podem ser ativados mecanorreceptores, resultando em

estímulos inespecíficos que nem sempre refletem a neurofisiologia da nocicepção. Particularmente, o teste de von Frey, tem sido usado para avaliar através do estímulo mecânico inofensivo e crescente (alodinia mecânica) a sensibilidade tecidual provocada pela incisão (Freitas Rodrigues et al., 2020).

O desenvolvimento de sintomas neuropáticos em volta da ATM na área operada tem sido 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). Esse procedimento tem sido 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 tem é acomodado a uma gaiola plástica individual e o Von Frey test é aplicado na superfície da pele em volta da ATM por no máximo 10 segundos (Freitas Rodrigues et al., 2020) (Figura 2.1).

Muitos dos experimentos realizados com metodologias que empregam estímulos dolorosos são realizados em animais, os quais apresentam reações comportamentais compatíveis com a sensação de dor, porém, uma vez que não é possível determinar objetivamente se a sensação apresentada é realmente dor (já que o animal não pode se comunicar), é preferível classificá-la como sendo resultado da ativação das vias nociceptivas. Portanto, é possível denominar tais reações em animais experimentais como nocicepção.

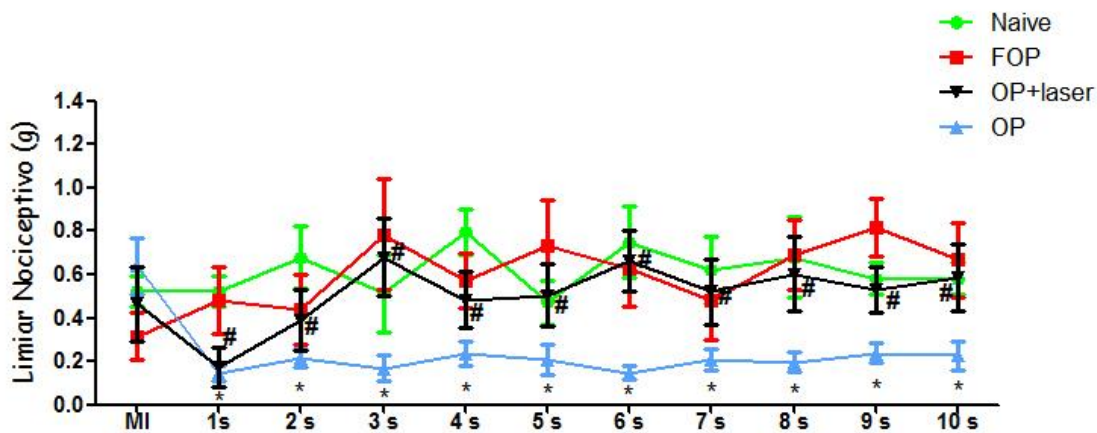
Figura 2.1 – Ilustração do teste de estimulação tátil – Filamentos de Von Frey



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

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 2.2) 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 decima sessão analisada.

Figura 2.2 – Efeito da aplicação do laser de baixa intensidade sobre a resposta nociceptiva nos ratos com lesão do disco articular



Fonte: O autor.

[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].

3 PROPOSIÇÃO

A proposta deste trabalho foi analisar os efeitos da Fotobiomodulação (PBM) com laser de baixa intensidade na:

- 1- Atividade nociceptora através da expressão substância P (SP), receptor do potencial transiente vaniloide do subtipo-1 (TRPV-1) e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP).
- 2- Na expressão de citocinas pró-inflamatórias: Interleucina 6 (IL-6), Interleucina 1 beta (IL1- β) e Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) nos tecidos articulares após lesão unilateral do disco da articulação temporomandibular (ATM) em ratos.
- 3- Avaliação das alterações teciduais em análise histológica com coloração H & E e análise histomorfométrica.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 40 ratos (*Rattus norvegicus*) Wistar, com dois meses de idade e pesando em média 200 a 220 gramas, tendo sido realizado cálculo amostral para determinação do n. 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, com dieta padrão composta por ração comercial granulada para roedores e água *ad libitum*. 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. Os ratos foram provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

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 n° 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 n° 037/2015, 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). Esse projeto de pesquisa seguiu as diretrizes de estudos experimentais em animais ARRIVE (2010).

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 profilaxia antibiótica, 15 minutos antes da anestesia, com a injeção intraperitoneal do

antibiótico Benzetacil (Benzetacil®, Eurofarma Laboratórios, São Paulo, SP, Brasil) numa dose de 80.000 UI/kg de peso vivo. Foi realizada tricotomia do lado direito da face na região da articulação temporomandibular, e antissepsia com solução tópica de polivinilpirrolidona-iodo a 10%, seguida de aposição de campos estéreis 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 bisturi com lâmina nº 15, seguida da divulsão do plano muscular e dos tecidos subjacentes, que foram mantidos afastados (Toledo et al., 2014).

Os animais foram divididos distribuídos de forma randomizada em 4 grupos experimentais, com 10 animais cada (n=10), da seguinte maneira:

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

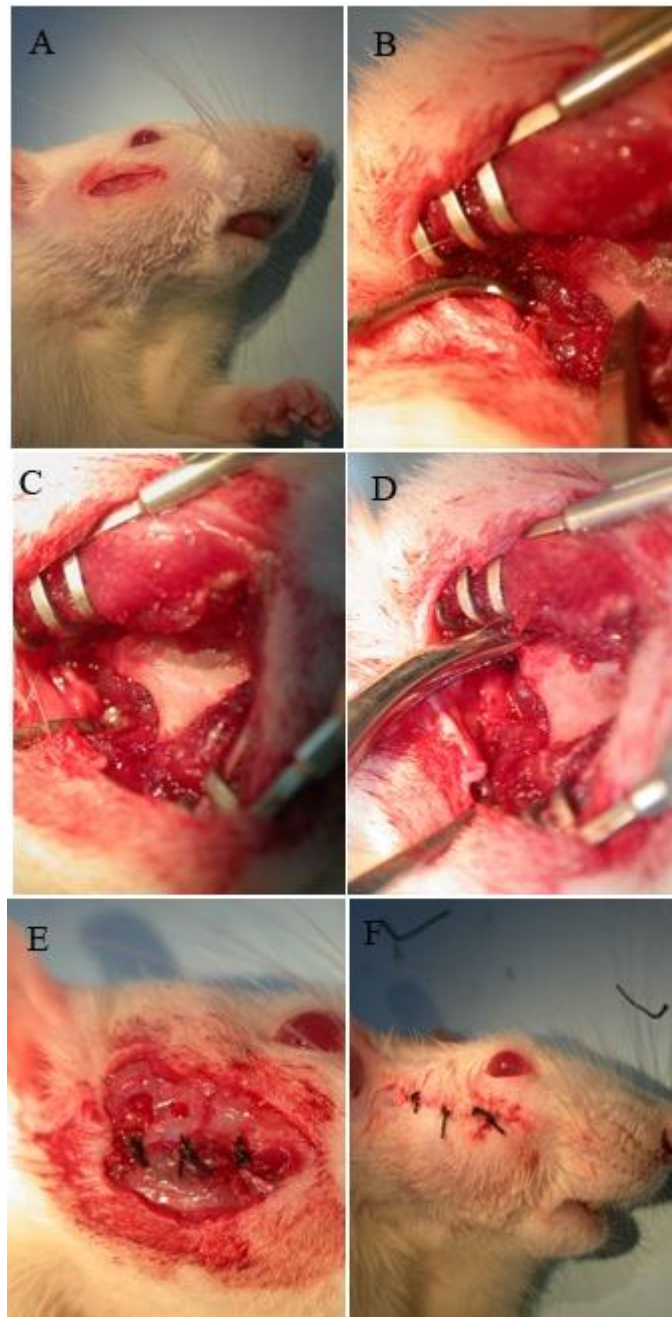
2. Grupo falso operado e irradiação de laser (SHAM + PBM): Controle submetido à laserterapia.

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

4. Grupo controle (Naive): Sem qualquer procedimento.

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, sendo então levados novamente ao biotério (Figura 4.1).

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 músculo masseter após separação das bordas da incisão e em **C** vemos a articulação temporomandibular após acesso e em **D** vemos o pinçamento do disco utilizando uma pinça hemostática curva, segundo dente da cremalheira, em **E** vemos a sutura do plano muscular em **F** vemos a sutura da pele



Fonte: Laboratório de neuroanatomia funcional da dor. Departamento de Anatomia. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP). Autor: Alex de Freitas Rodrigues.

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E APLICAÇÃO DO LASER PÓS-LESÃO

Dois grupos (Op + PBM, SHAM + PBM) 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/cm.² e os outros dois grupos (Op, Naive) não sofreram aplicação do laser. Para aplicação do laser, os ratos foram contidos de forma manual, sem a aplicação de anestesia. Os parâmetros do laser utilizado neste estudo encontram-se no quadro 4.1.

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 (Martins et al., 2013) (Figuras 4.2 e 4.3). 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 ou imunohistoquímica.

Figura 4.2 - Esquema dos pontos de aplicação do laser. Vemos os pontos de aplicação. Ponto central, ponto superior, ponto inferior, ponto a direita e a esquerda. Todos os pontos com uma distância de 1 cm do ponto central

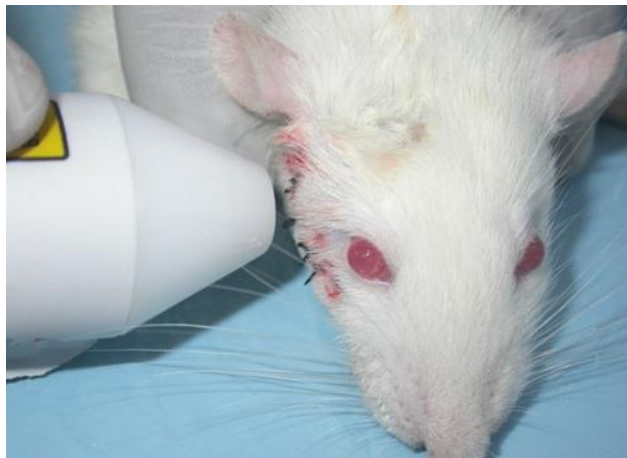


Fonte: O autor.

Figura 4.3 - Esquema do modo de contenção manual do animal para aplicação do laser. Vemos a contenção com a mão esquerda e a aplicação do laser



Figura 4.4 - Esquema do protocolo de aplicação. Vemos a distância do aparelho em relação aos animais sob tratamento (1 cm)



Fonte: Laboratório de neuroanatomia funcional da dor. Departamento de Anatomia. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP). Autor: Alex de Freitas Rodrigues.

Quadro 4.1 - 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
PARÂMETROS 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
Potência	70wpk

Fonte: Martins et al. (2013).

4.3 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.

4.4 IMMUNOBLOTTING

Cabe mencionar que inicialmente, os animais foram utilizados nos testes comportamentais e após seu término, os mesmos foram eutanaziados (utilizando guilhotina). As amostras dos tecidos articulares foram coletadas utilizando pool de tecidos articulares composto por cápsula, disco e ligamentos de 4 animais por grupo, rapidamente e homogeneizadas em sonificador 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 (ditiotretol), 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 GDAPH, 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).

4.5 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Para os ensaios de immunoblotting a intensidade das bandas reativas formadas será 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 $p < 0.05$ (Snedecor et al., 1946).

Quadro 4.2 - Anticorpos utilizados nos experimentos de *immunoblotting* e suas respectivas concentrações

Proteína Método	Animal de	Immunoblotting
Policlonal anti-CGRP (ab47027 Abcam INC.)	Coelho	1:1.000
Policlonal anti-TRPV1 (alomone labs)	Coelho	1:1.000
Policlonal anti-Substância P (NG1865736 - Millipore Corportion)	Coelho	1:1.000
Monoclonal anti-GDAPH (Sigma – Saint Louis)	Camundongo	1:10.000
Anti-TNF- α (ab9755 Abcam INC.)	Rato	1:1.000
Anti-IL 1 beta (ab9722 – Abcam INC.)	Coelho	1:1.000
Anti-IL 6 (ab6672 – Abcam INC.)	Coelho	1:1.000
HRP anti-camundongo (Amershan Biosciences – Buckinghamshire, UK)	Coelho	1:5.000
HRP anti-coelho (Amershan Biosciences – Buckinghamshire, UK)	Camundongo	1:5.000
HRP anti-rato (Jackson ImmunoResearch Laboratories; West Grove, PA)	Coelho	1:5.000

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

4.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA NOS DIFERENTES GRUPOS

Para análise histológica, foram utilizados 4 cortes coronais seriados das ATMs de cada animal por grupo (3), corados com Hematoxilina e Eosina (H & E), foram avaliadas as características da superfície articular do côndilo, as diversas camadas que compõe a parte cartilaginosa e a óssea, o disco articular e inserções musculares presentes. Entre os tecidos moles foi observada celularização, presença de vasos e suas características presentes. Todos os espécimes foram avaliados no microscópio óptico nos aumentos de 10X, 40X, 100X e 400X.

4.7 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA NOS DIFERENTES GRUPOS

Todos os blocos de espécimes foram descalcificados, depois desidratados em uma série de álcool graduada ascendente e posteriormente embebidos em parafina. Os blocos resultantes parafinados foram cortados no plano coronal da ATM usando um micrótomo Leica RM 2125RT (Leica Biosystem, Nussloch, Alemanha). Seções 5 µm de espessura foram cortadas e coletadas em microlâminas New Silane III revestidas (Muto Pure Chemicals Co., Ltd., Tóquio, Japão). As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) para avaliação qualitativa e quantitativa. Para a captura e análise as lâminas foram cegadas em relação aos grupos sendo dada uma nomenclatura aleatória. Cortes contínuos na parte central foram escolhidos, e as imagens foram capturadas com aumento de 100 X usando um microscópio de luz (Leica Biosystem, Nussloch, Alemanha). A espessura do disco, o espaço articular superior e o espaço articular inferior foram medidos usando Image-J software (National Institute of Health, Bethesda, MD, EUA). Análise estatística foi realizada usando o teste Anova, Bonferroni e Tukey ou Kruskal-Wallis, conforme o caso.

5 RESULTADOS

Os resultados são demonstrados pela expressão das substâncias nociceptoras, da expressão das citocinas pró-inflamatórias, pela análise histológica e análise histomorfométrica dos tecidos articulares nos diferentes grupos.

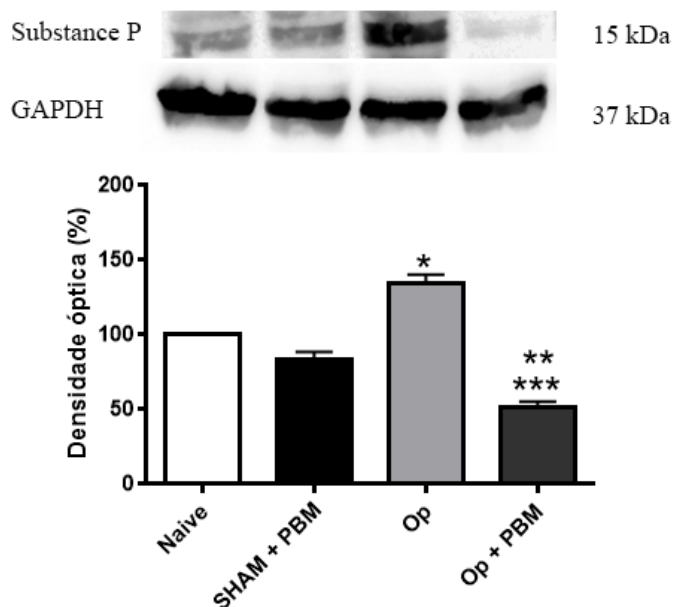
5.1 EXPRESSÃO DA ATIVIDADE NOCICEPTORA

A atividade nociceptora foi demonstrada pela avaliação da expressão da Substância P, CGRP e TRVP-1. Os resultados são demonstrados através do gradiente de concentração da marcação antígeno anticorpo nas bandas proteicas separadas e por meio de gráficos com valores médios de cada grupo, incluindo as diferenças significantes quando presentes.

5.1.1 Efeito sobre a expressão de SP

Nos resultados de imunoblotting para SP (n=5), podemos observar um aumento na densidade óptica das bandas marcadas para SP no disco articular da ATM no grupo de animais operados (Op) quando comparado com o grupo controle (Naive). Após o tratamento (Op + PBM) foi observado uma diminuição na expressão de SP, quando comparado com as bandas dos grupos usados como controle (Naive e Op + PBM e ao grupo operado sem tratamento. Ainda, não foi possível observar alteração significativa no grupo falso-operado (Op + PBM), também utilizado como controle) em relação ao Naive. A densidade média para o grupo controle, Naive, foi considerada 100% (Figura 5.1).

Figura 5.1 - Efeito do tratamento com laser sobre a expressão de Substância P no disco articular



Fonte: O autor.

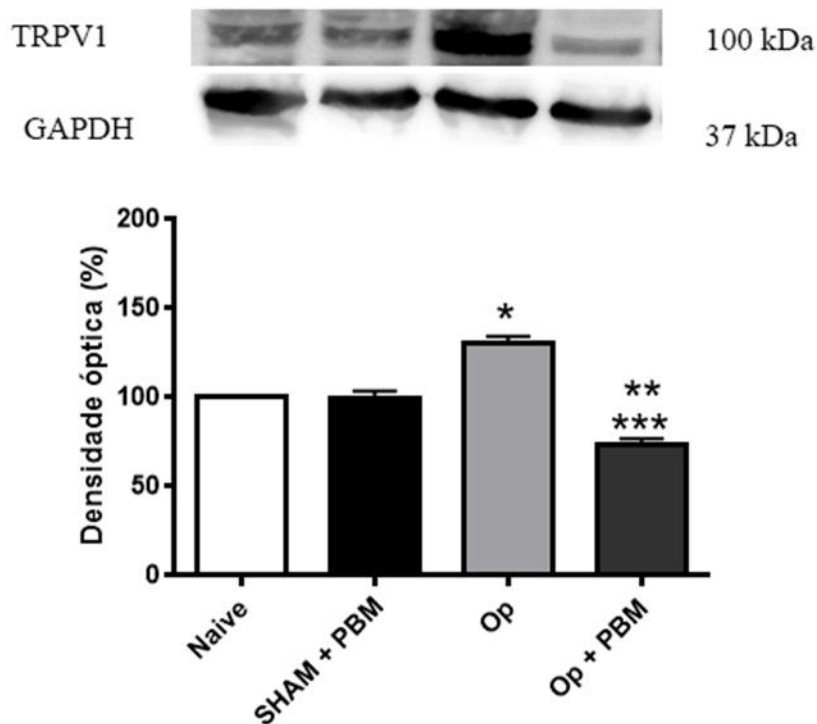
Os resultados representam a média \pm epm de 5 animais por grupo. * $p \leq 0,05$ e ** $p \leq 0,01$ comparado com os grupos controle (Naive e Op + PBM) e *** $p \leq 0,001$ comparado com o grupo operado (Op).

5.1.2 Efeito sobre a expressão do TRPV-1

Nos resultados de imunoblotting para TRPV-1 ($n=5$), podemos observar um aumento na densidade óptica das bandas marcadas para TRPV-1 no disco articular do grupo de animais operados (Op) quando comparado com o grupo controle (Naive). Após o tratamento (Op + PBM) foi observada uma diminuição na expressão de TRPV-1, quando comparado com as bandas dos demais grupos.

Ainda, não foi possível observar alteração significativa no grupo falso-operado (Op + PBM 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 da laserterapia sobre a expressão de TRPV-1 no disco articular



Fonte: O autor.

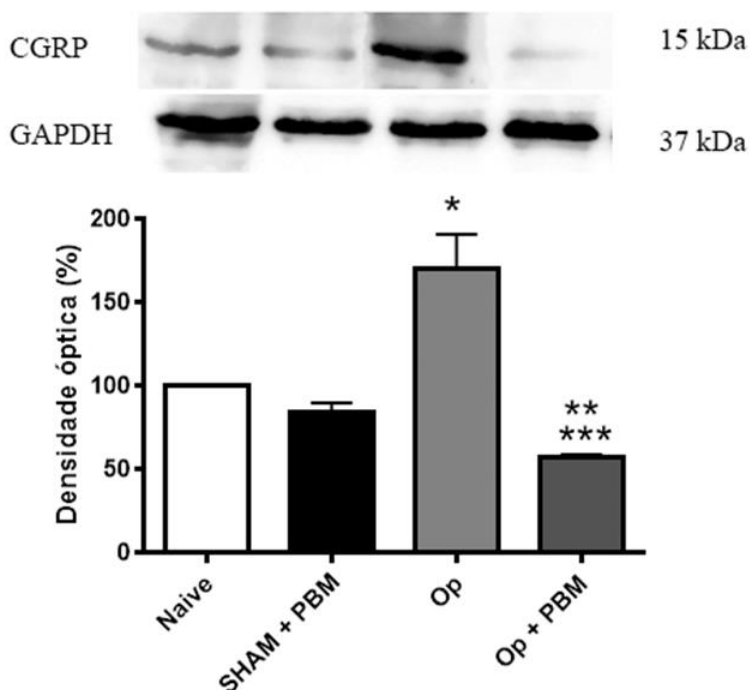
Efeito do tratamento sobre a expressão do receptor TRPV1 no disco articular. Os resultados representam a média \pm epm de 5 animais por grupo * $p \leq 0,05$ e ** $p \leq 0,01$ comparado com os grupos controle (Naive e Op + PBM) e *** $p \leq 0,01$ comparado com o grupo tratado (Op + PBM).

5.1.3 Efeito sobre a expressão de CGRP

Em nossos resultados de imunoblotting para CGRP (n=5), observamos um aumento da expressão de CGRP no grupo de animais operados (Op) quando comparamos com os grupos usados como controle (Naive e Op + PBM), já no grupo tratado (Op + PBM) visualizamos uma diminuição na expressão de CGRP comparado com os demais grupos, não ocorrendo diferenças estatística entre eles.

Ainda, não foi possível observar alteração significativa no grupo falso-operado (Op + PBM, 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 do tratamento com laser sobre a expressão de CGRP no disco articular



Fonte: O autor.

Os resultados representam a média \pm epm de 5 animais por grupo. * $p \leq 0,05$ e ** $p \leq 0,01$ comparado com os grupos controle (Naive e Op + PBM) e *** $p \leq 0,001$ comparado com o grupo operado (Op).

5.2 EFEITOS SOBRE A EXPRESSÃO DAS CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS

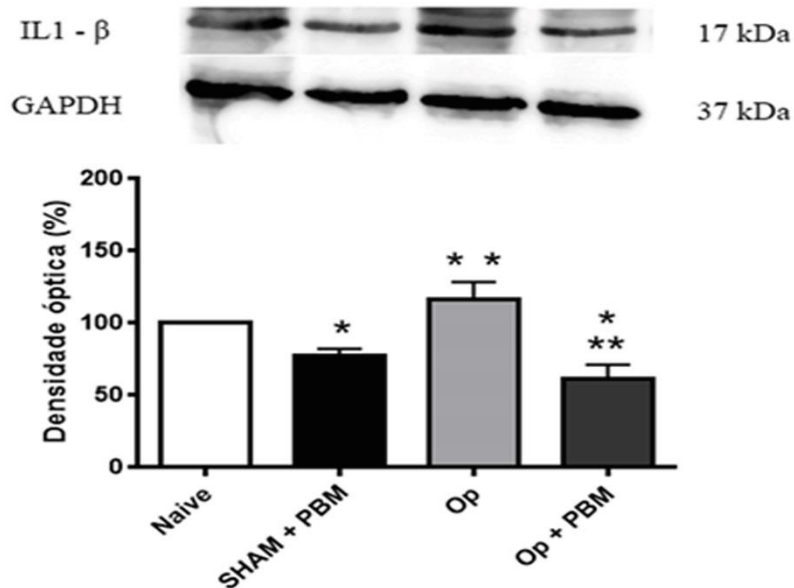
A demonstração das citocinas pró-inflamatórias foi realizada pela avaliação da expressão da IL1- β , IL-6 e TNF- α . Os resultados são demonstrados através do gradiente de concentração da marcação antígeno anticorpo nas bandas proteicas separadas e por meio de gráficos com valores médios de cada grupo, incluindo as diferenças significantes quando presentes.

5.2.1 Efeitos sobre a expressão de IL1 β

Em nossos resultados de imunoblotting para IL1- β (n=5), observamos um aumento da expressão de IL1- β no grupo de animais operados (Op) quando comparamos com os grupos usados como controle (Naive e Op + PBM), já no grupo tratado (Op + PBM) visualizamos uma diminuição na expressão de IL1- β comparado com os demais grupos.

Ainda, não foi possível observar alteração significativa no grupo falso-operado (Op + PBM, 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 IL1- β no disco articular



Fonte: O autor.

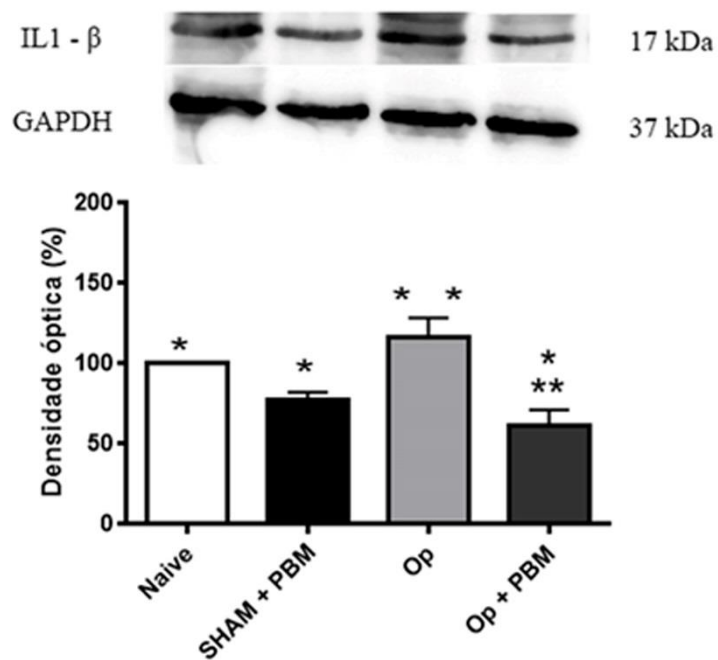
Os resultados representam a média \pm epm de 5 animais por grupo. * $p \leq 0,05$ comparado com os grupos controle (Naive e Op + PBM) e ** $p \leq 0,01$ comparado com o grupo operado (Op).

5.2.2 Efeito sobre a expressão de IL-6

Nos resultados de imunoblotting para IL-6 (n=4), podemos observar um aumento na densidade óptica das bandas marcadas para IL-6 no disco articular da ATM do grupo de animais operados (Op) quando comparado com os grupos controles (Naive e Op + PBM).

Ainda, não foi possível observar alteração significativa no grupo falso-operado (Op + PBM), também utilizado como controle) em relação ao Naive. A densidade média para o grupo controle Naive foi considerada 100% (Figura 5.5).

Figura 5.5 - Efeito do tratamento com laser sobre a expressão de IL-6 no disco articular



Fonte: O autor.

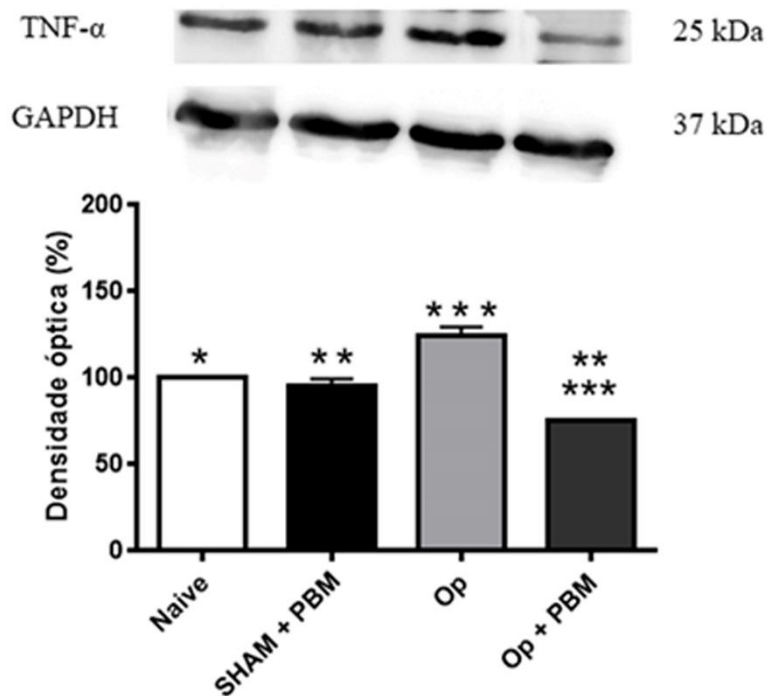
Os resultados representam a média \pm epm de 4 animais por grupo. * $p \leq 0,05$ comparado com os grupos controle (Naive e Op + PBM) e ** $p \leq 0,01$ comparado com o grupo operado (Op).

5.2.3 Efeitos sobre a expressão de TNF- α

Nossos resultados de imunoblotting para TNF- α (n=4), no disco articular, revelaram um aumento na densidade óptica das bandas marcadas para TNF- α no disco articular de animais operados (Op) quando comparado aos grupos controles (Naive e Op + PBM). Após o período de tratamento vimos uma diminuição da expressão de TNF- α em relação aos outros grupos.

Ainda, não foi possível observar alteração significativa no grupo falso-operado Op + PBM, também utilizado como controle) em relação ao Naive. A densidade média para o grupo controle, Naive, foi considerada 100% (Figura 5.6).

Figura 5.6 - Efeito do tratamento com laser sobre a expressão de TNF- α no disco articular



Fonte: O autor.

Os resultados representam a média \pm epm de 4 animais por grupo. * $p \leq 0,05$ e ** $p \leq 0,05$ comparado com os grupos controle (Naive e Op + PBM) e *** $p \leq 0,01$ comparado com o grupo operado (Op).

5.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA NOS DIFERENTES GRUPOS

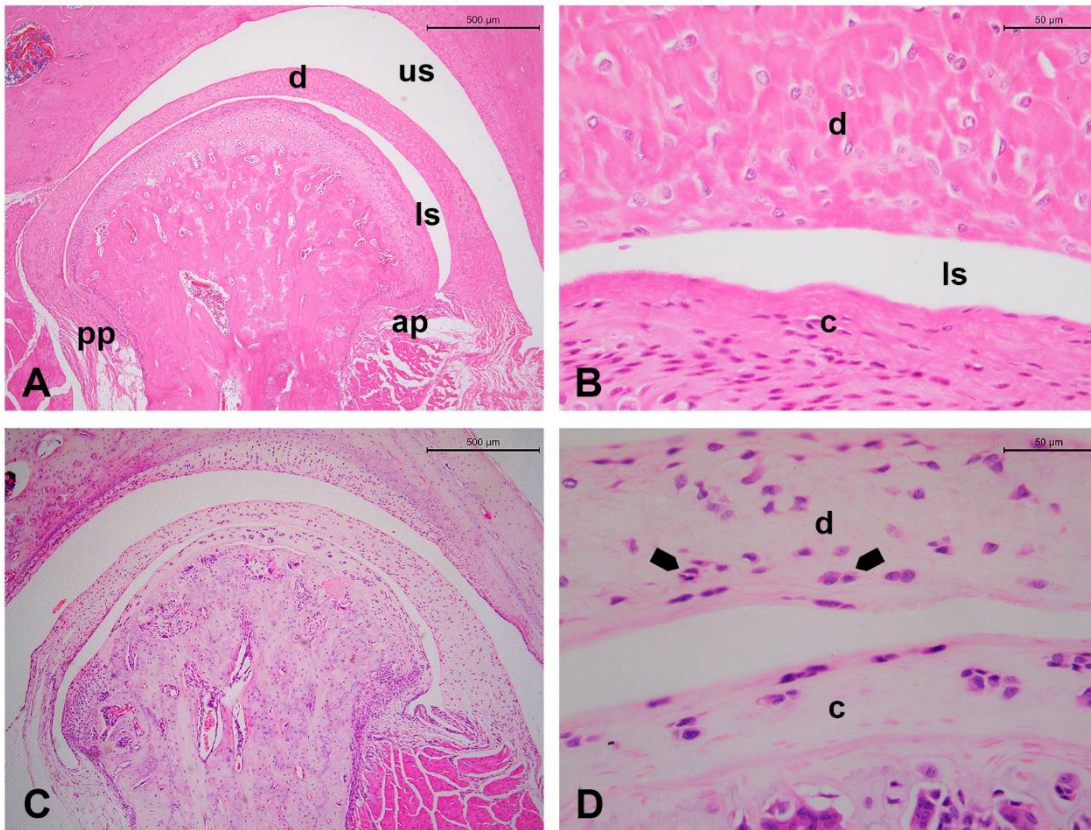
A análise histológica da ATM nos diferentes grupos é descrita de acordo com as características da superfície articular do côndilo, as diversas camadas que compõe a parte cartilaginosa e a óssea, o disco articular e inserções musculares presentes. Entre os tecidos moles foi observada celularização, presença de vasos e suas características presentes. Esta fase é muito importante pois permite identificar, caracterizar, analisar e descrever as estruturas dos tecidos articulares correlacionando os efeitos da lesão experimental e do tratamento com protocolo de fotobiomodulação.

5.3.1 Naive

Os cortes histológicos sagitais da região da articulação temporomandibular revelaram côndilo mandibular em posição no espaço articular em relação ortogonal à fossa temporal, com disco articular interposto, delimitando os espaços articulares superior e inferior (Figura 5.7A). A superfície articular do côndilo era formada por cartilagem, exibindo as camadas hipertrófica, de transição e hialina com maior nitidez. Os músculos pterigoideo lateral e medial eram visíveis, com inserção de fibras musculares na porção anterior da região cervical do côndilo (Figura 5.7A). Na maioria dos cortes histológicos, o disco exibia formato regular, bicôncavo, com estreitamento na porção central, sendo constituído por tecido conjuntivo denso pouco vascularizado (Figura 5.7B). Em alguns cortes histológicos, o estreitamento do disco avançava também para porção posterior e, nesses casos, a morfologia da cabeça do côndilo também variou, revelando formato mais irregular (Figura 5.7C). Em alguns espécimes, foi possível identificar células com morfologia sugestiva de

condroblastos, localizadas principalmente na interface do disco próxima à superfície condilar (Figura 5.7D).

Figura 5.7 - (grupo Naive): Cortes histológicos representativos da região da articulação temporomandibular no grupo Naive. **A:** Visão sagital da região do côndilo mandibular, com presença do disco articular (d) delimitando os espaços articulares superior (us) e inferior (ls). ap: porção anterior. pp: porção posterior (Hematoxilina-eosina, aumento original de 50x). **B:** Detalhe da interface do disco (d) próxima da superfície condilar (c), exibindo tecido conjuntivo denso com ausência de vascularização nessa região. ls – espaço articular inferior (Hematoxilina-eosina, aumento original de 400x). **C:** Situação de disco articular com estreitamento se estendendo para a porção posterior, com morfologia mais irregular da cabeça do côndilo (Hematoxilina-eosina, aumento original de 50x). **D:** Detalhe da interface do disco (d) próxima da superfície condilar (c), exibindo células semelhantes a condroblastos (setas) (Hematoxilina-eosina, aumento original de 400x)

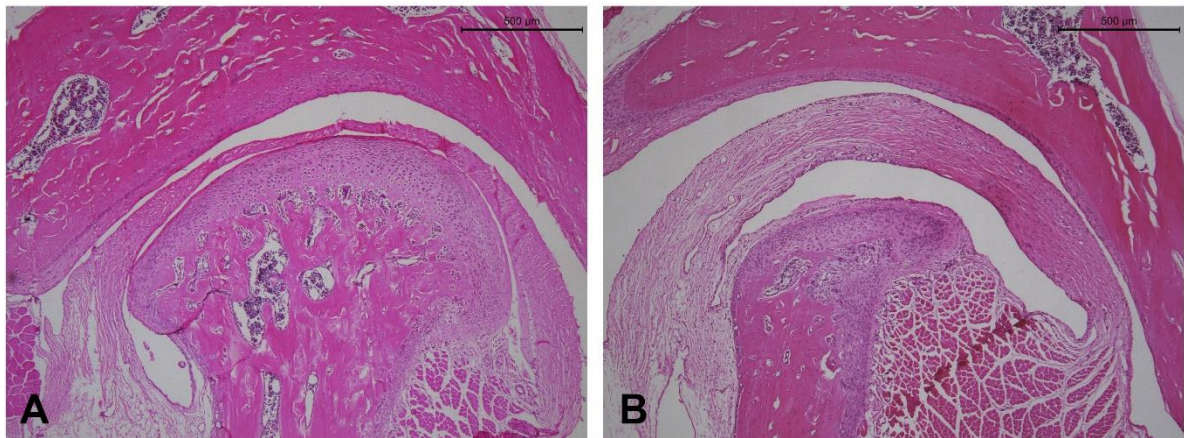


Fonte: O autor.

5.3.2 Falso Operado (SHAM + PBM)

Na maioria dos cortes histológicos do grupo SHAM +PBM, a articulação temporomandibular exibiu aspecto semelhante ao encontrado o grupo Naive, com estreitamento discal visível em alguns casos (Figura 5.8A). Em dois animais, foi possível verificar espessamento do disco articular e modificação da morfologia da cabeça do côndilo (Figura 5.8B), sugerindo variação de posicionamento condilar no momento da eutanásia ou então nível mais aprofundado do corte histológico.

Figura 5.8 - Cortes histológicos representativos do grupo SHAM+PBM. **A**: Aspecto normal da articulação temporomandibular, com ligeiro estreitamento aumentado do disco articular (Hematoxilina-eosina, aumento original de 50X). **B**: Em dois animais, o disco articular exibiu espessamento e a cabeça do côndilo, alteração da morfologia, aspectos provavelmente oriundos do posicionamento condilar no momento da eutanásia ou do nível de aprofundamento do corte



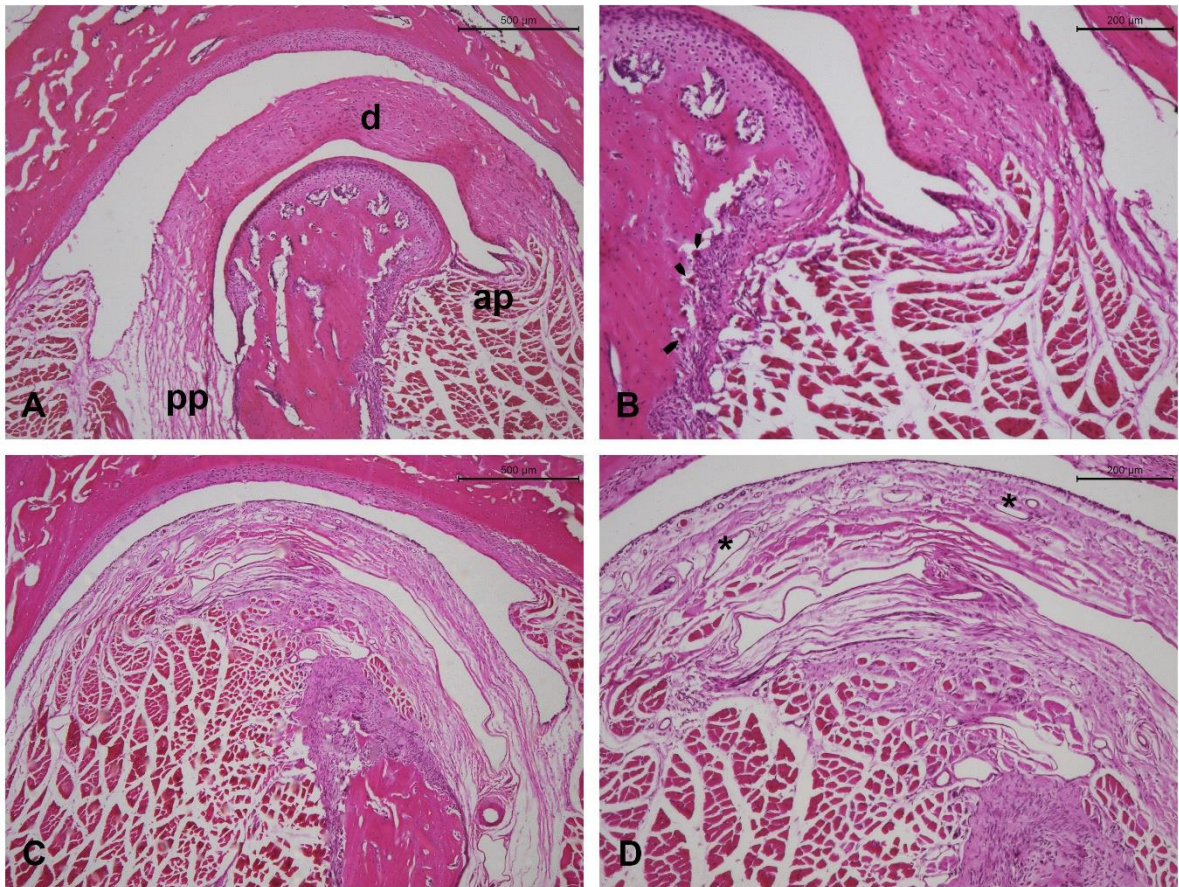
Fonte: O autor.

5.3.3 Operado

No grupo Operado, em três animais os cortes histológicos mostraram espessamento do disco articular (Figura 5.9A) e intensa atividade osteoclástica na região medial do côndilo, adjacente à inserção das fibras musculares (Figura 5.9B). Nos demais indivíduos, o disco exibiu perda da sua morfologia original, fundindo-se

com as fibras musculares, na porção tanto anterior quanto posterior (Figuras 5.9C e 5.9D). Nesses casos, o disco foi composto por tecido conjuntivo menos denso, exibindo pouca celularidade e grande quantidade de vasos com luzes amplas e parede delgada, sugerindo vascularização linfática (Figura 5.9D). A superfície articular do côndilo estava irregular, com aumento das camadas proliferativa e hialina, e o espaço articular inferior estava reduzido (Figura 5.9C).

Figura 5.9 - (grupo Operado) Cortes histológicos representativos do grupo Operado. **A:** Articulação temporomandibular exibindo espessamento do disco articular, com preservação da anatomia do côndilo (Hematoxilina-eosina, aumento original de 50x). **B:** Detalhe da porção anterior do disco, no qual se observa inserção das fibras musculares e intensa atividade osteoclástica na porção medial do côndilo (setas). **C:** Outra situação na qual o disco articular fusionou com as fibras musculares, perdendo sua morfologia original e alterando a área do espaço articular inferior. A anatomia do côndilo está alterada, sem o correto posicionamento da cabeça condilar e hiperplasia da camada de cartilagem proliferativa e hialina. **D:** Detalhe do disco articular exibindo tecido conjuntivo menos denso, com grande quantidade de fibras musculares interpostas e aberturas vasculares com luzes amplas e parede delgada, sugerindo vascularização linfática

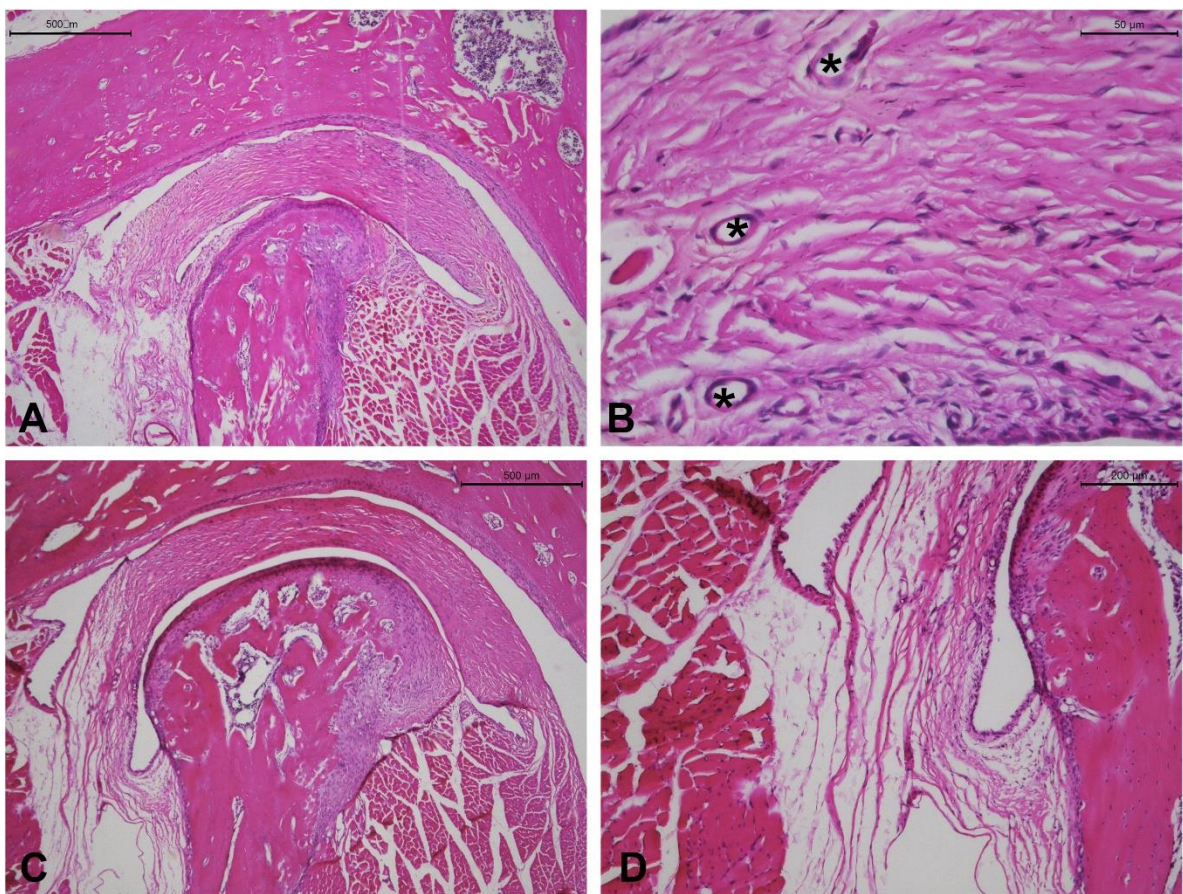


Fonte: O autor.

5.3.4 Operado+Irrradiado

No grupo Operado+Irrradiado, a articulação temporomandibular exibiu disco articular hiperplásico, com espessamento homogêneo em toda sua extensão, acompanhado de redução do espaço articular, principalmente inferior (Figura 5.10A). O disco exibia tecido conjuntivo denso, mais celularizado e com maior quantidade de vasos com luz reduzida e parede espessa, compatíveis com capilares e arteríolas (Figura 5.10B). Apesar do espessamento do disco e de, em alguns casos, haver alteração da morfologia do côndilo (Figura 5.10C), a relação com as fibras musculares manteve-se preservada, com inserção adequada dessas fibras, principalmente na porção anterior do disco (Figuras 5.10A e 5.10C). Na porção posterior do disco, a inserção na região cervical do côndilo também se manteve intacta, apesar de haver hiperplasia do disco nessa região e maior visibilidade da cápsula articular (Figura 5.10D).

Figura 5.10 - (Grupo Operado+Irradiado) Cortes histológicos representativos do grupo Operado+Irradiado. **A:** Aspecto da articulação temporomandibular exibindo hiperplasia do disco articular, com espessamento homogêneo de toda a extensão do disco e alteração da morfologia da cabeça do côndilo. O posicionamento do côndilo em relação à fossa temporal está compatível com a normalidade, assim como a inserção do disco nas porções anterior e posterior (Hematoxilina-eosina, aumento original de 50x). **B:** Detalhe da disco articular, com a presença de tecido conjuntivo bem denso e celularizado, exibindo grande quantidade de vasos com luz reduzida e parede espessa, compatíveis com capilares e arteríolas (□) (Hematoxilina-eosina, aumento original de 400x). **C:** Outra situação observada nesse grupo, com presença de hiperplasia do disco e morfologia preservada do côndilo (Hematoxilina-eosina, aumento original de 50x). **D:** Detalhe da porção posterior do disco, que exhibe ampla inserção na região cervical do côndilo e maior nitidez da cápsula articular (Hematoxilina-eosina, aumento original de 400x)



Fonte: O autor.

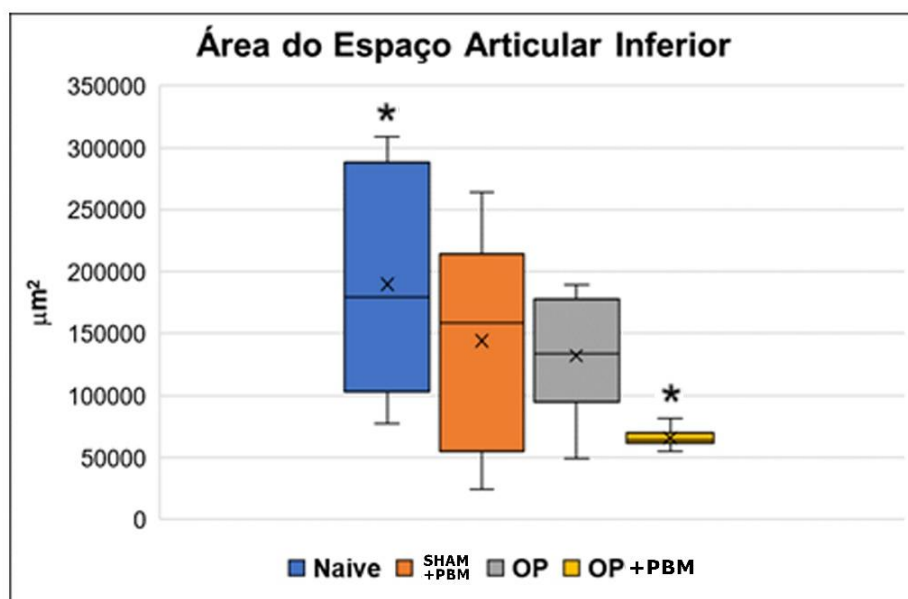
5.4 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA NOS DIFERENTES GRUPOS

A análise histomorfométrica nos cortes histológicos da ATM nos diferentes grupos é descrita de acordo com as mensurações realizadas do espaço articular superior (área e perímetro), espaço articular inferior (área e perímetro) e disco articular (área, perímetro e fator de forma). Os resultados das análises estatísticas realizadas são descritos a partir da descrição de cada estrutura avaliada.

5.4.1 Área do Espaço Articular Superior

Nossos resultados de análise histomorfométrica da área do espaço articular inferior revelaram um menor valor para o grupo Op + PBM, havendo uma diferença estatística significativa, com $p=0,026$, entre animais operados e Irrradiados (Op + PBM) quando comparados ao grupo controle (Naive) (Figura 5.11).

Figura 5.11 - Análise quantitativa espaço articular inferior. (A) Área do espaço articular inferior



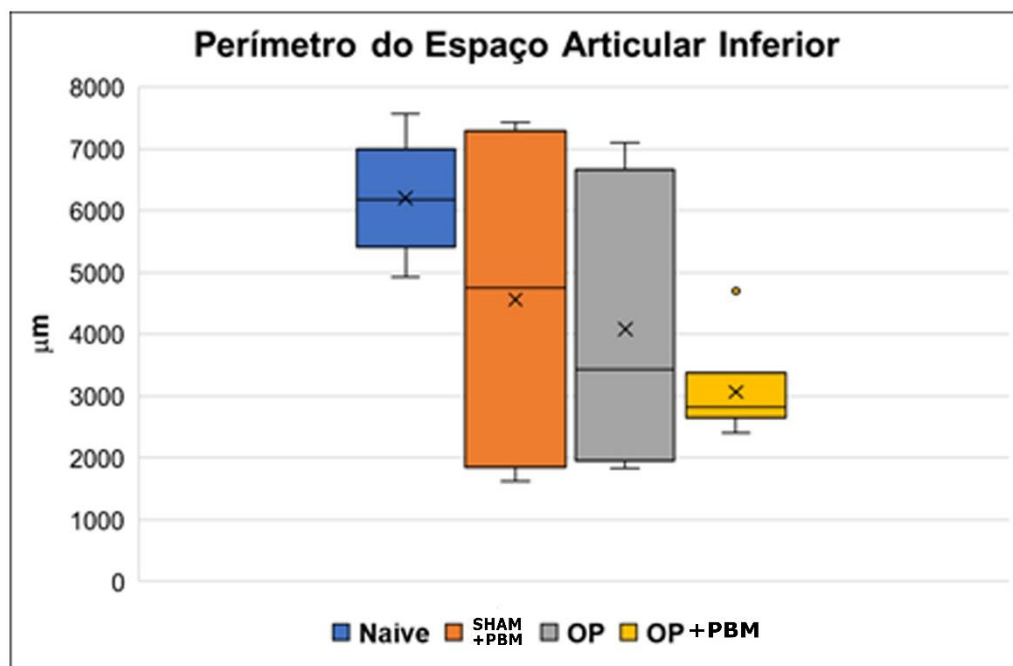
Fonte: O autor.

Os resultados mostram uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo Op+PBM p: 0,026 quando comparado com os grupos controle (Naive).

5.4.2 Perímetro do Espaço Articular Inferior

Nossos resultados de análise histomorfétrica no perímetro não mostraram uma diferença estatisticamente significativa, mas houve uma tendência com o perímetro menor no grupo Op + PBM quando comparado aos demais grupos (Figura 5.12).

Figura 5.12 - Análise quantitativa espaço articular inferior, (B) perímetro do espaço articular inferior

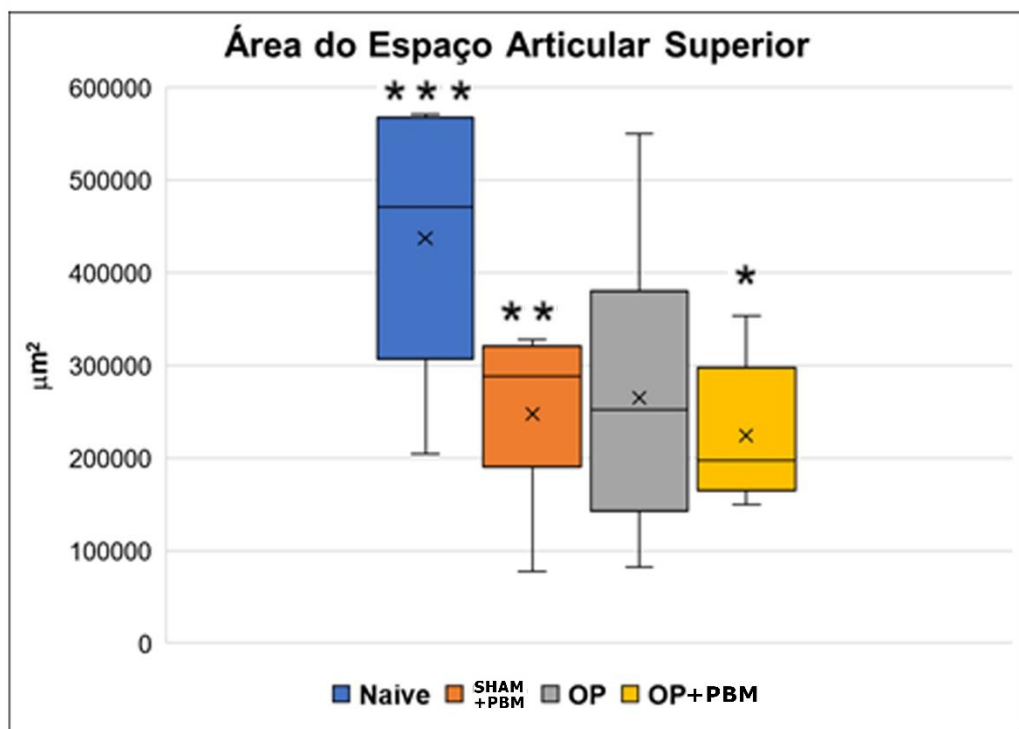


Fonte: O autor.

5.4.3 Área do Espaço Articular Superior

Nossos resultados de análise histomorfétrica na área do espaço articular superior revelaram um valor menor para o grupo Op + PBM, havendo uma diferença estatística significativa, com $p=0,024$, entre animais operados e Irrradiados (Op + PBM) e Naive e entre SHAM+PBM e Naive (Figura 5.13).

Figura 5.13 - Análise quantitativa do espaço articular superior. (A) do espaço articular superior

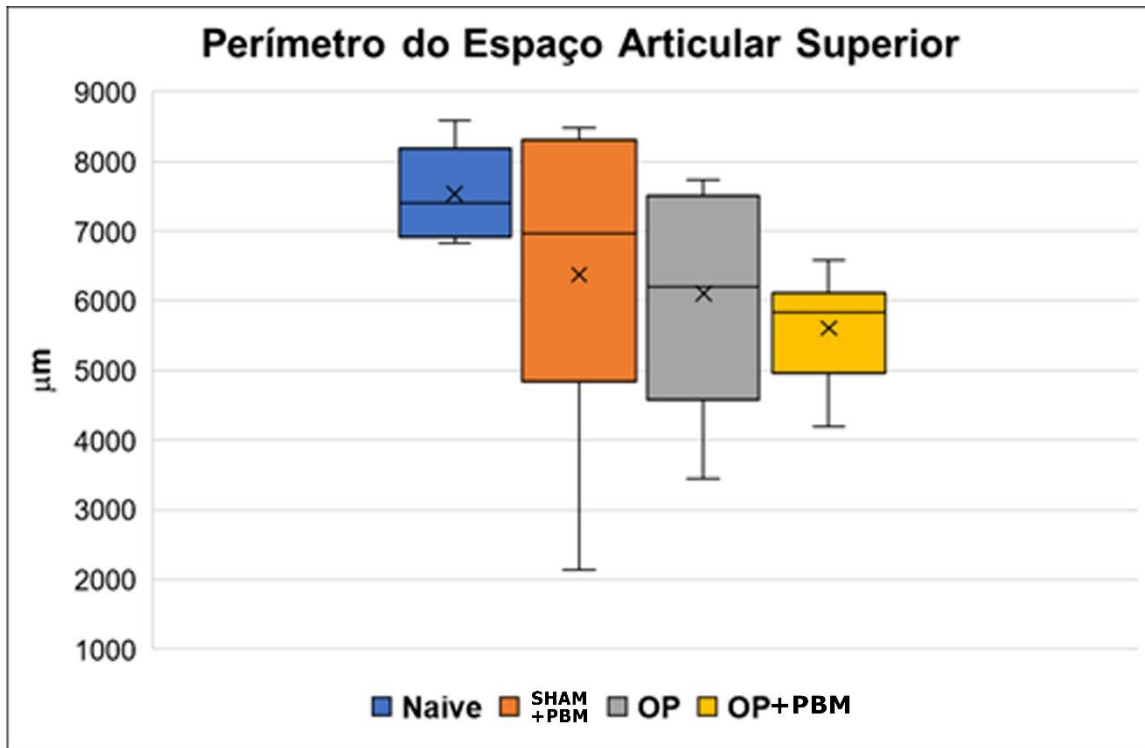


Fonte: O autor.

5.4.4 Perímetro do Espaço Articular Superior

Nossos resultados de análise histomorfétrica no perímetro do espaço articular superior não mostraram uma diferença estatisticamente significativa, mas houve uma tendência com o perímetro menor no grupo Op + PBM quando comparado aos demais grupos (Figura 5.14).

Figura 5.14 - Análise quantitativa do espaço articular superior. (B) Perímetro do espaço articular superior

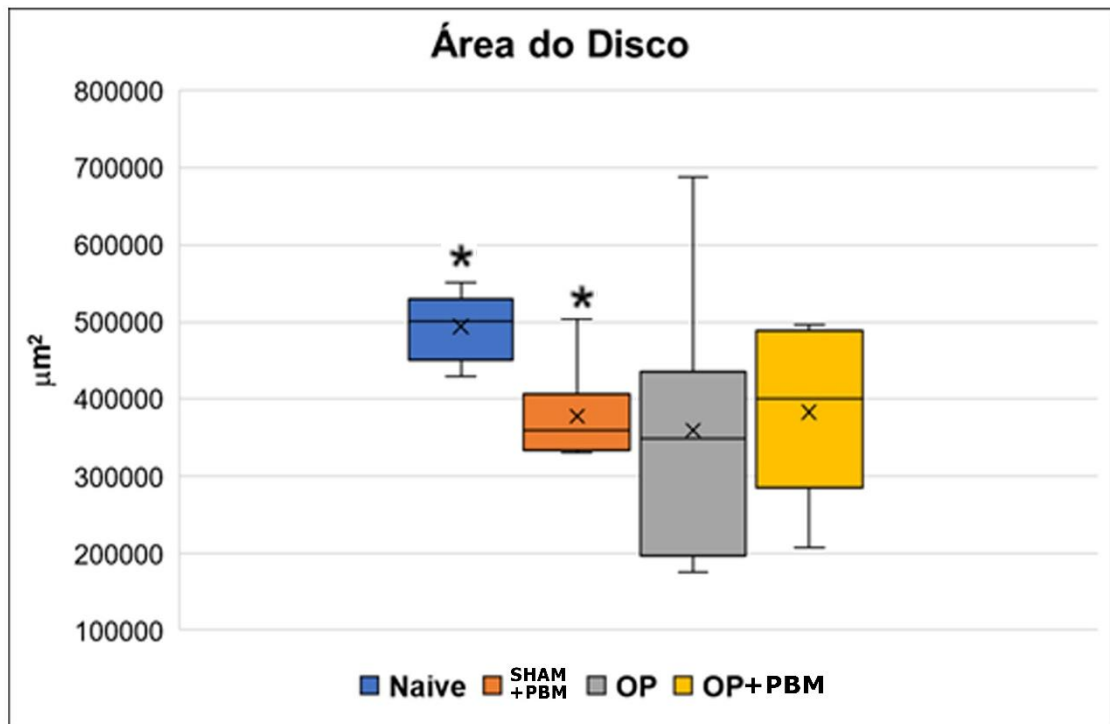


Fonte: O autor.

5.4.5 Área do Disco Articular

Nossos resultados de análise histomorfétrica na área do disco articular revelaram uma diferença estatística significativa, com $p=0,010$, entre o grupo controle Naive quando comparado ao grupo Op + PBM (Figura 5.15).

Figura 5.15 - Análise quantitativa do disco articular. (A) Área do disco articular

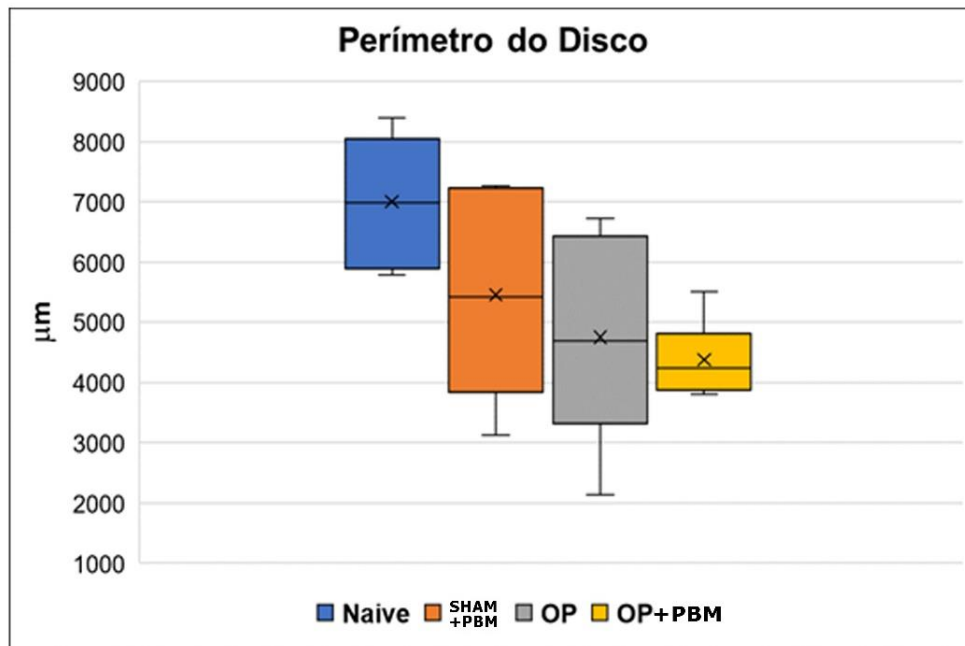


Fonte: O autor.

5.4.6 Perímetro do Disco Articular

Nossos resultados de análise histomorfétrica no perímetro do disco articular não mostraram uma diferença estatisticamente significativa, mas houve uma tendência com o perímetro menor no grupo Op + PBM quando comparado aos demais grupos (Figura 5.16).

Figura 5.16 - Análise quantitativa do disco articular. (B) Perímetro do disco articular

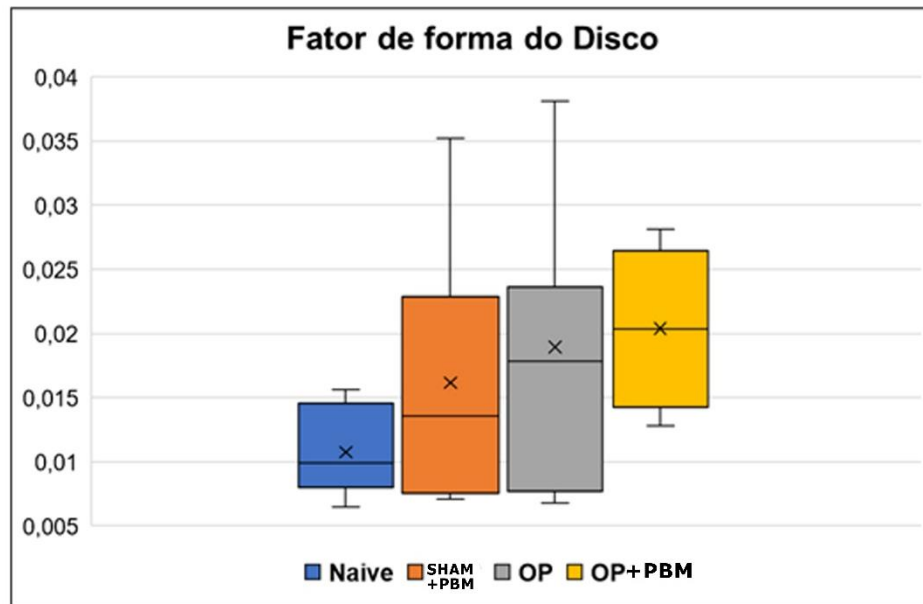


Fonte: O autor.

5.4.7 Fator de Forma do Disco Articular

Nossos resultados de análise histomorfétrica no fator de forma do disco articular mostraram um maior valor para o grupo Op + PBM, não mostraram uma diferença estatisticamente significante, mas houve uma tendencia com o fator de forma maior no grupo Op + PBM quando comparado aos demais grupos (Figura 5.17).

Figura 5.17 - Análise quantitativa do disco articular. (C) Fator de forma do disco articular



Fonte: O autor.

6 DISCUSSÃO

Neste trabalho realizamos um modelo de lesão física experimental no disco da ATM primeiramente descrito por Toledo et al. (2014). Esse modelo ao nosso ver foi capaz de mimetizar a situação clínica de dor da ATM acometida nos pacientes por problemas intra-articulares, quando comparado com os modelos que utilizam soluções medicamentosas ou compostos irritativos (Goulart et al., 2005; Carvalho et al., 2011; Barreto et al., 2013). Vale ressaltar que trabalhos anteriores que provocaram trauma unilateral experimental na ATM não mostraram alterações no lado controle (Ali; Sharawi 1994; Luz et al., 1997). A compressão experimental do disco no sentido anteroposterior fez emanar dor pela compressão das estruturas retro discais o que ao nosso ver mimetiza a sobrecarga funcional, e está relacionada a um componente inflamatório. Nós avaliamos os efeitos da PBM com luz laser de baixa intensidade nos tecidos do disco da ATM através da expressão de proteínas ligadas à atividade nociceptiva e a expressão de citocinas inflamatórias, utilizando Westernblotting. Ficou demonstrado que houve reversão total do limiar nociceptivo, associado à diminuição na expressão da Substância P, do TRPV-1 e do CGRP; também houve reversão do processo inflamatório, associado à diminuição na expressão da IL-6, TNF- α e IL-1 β dos animais tratados com laser.

Do ponto de vista clínico precisamos lembrar que existe uma maior complexidade e podemos subdividir os quadros clínicos 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 das disfunções (Okeson; de Leeuw, 2011). O modelo experimental utilizado, representado pelo trauma ao disco articular, mimetiza as disfunções do disco articular associadas a dor e um processo inflamatório (Toledo et al., 2014).

Em estudo anterior, diante desse modelo de lesão ao disco articular da ATM, houve aumento do comportamento nociceptivo e da expressão de SP, TRPV-1 e CGRP no núcleo trigeminal, havendo regressão da dor e da expressão desses peptídeos associados à nocicepção (Freitas Rodrigues et al., 2020).

A participação da SP no processo nociceptivo vem sendo estudado em animais, os quais mostraram quantidades alteradas desse neuropeptídeo no tecido lesado (Martins et al., 2013; Freitas Rodrigues et al., 2020). É encontrada em altas concentrações nas terminações aferentes da medula espinal, sendo o mediador da primeira sinapse da dor. A sinalização da substância P (SP) facilita a sensibilização nociceptiva em modelos de dor e sua sinalização também pode contribuir para o desenvolvimento de hiperalgesia pós-incisional (Sahbaie et al., 2009). Estudos têm mostrado que a administração de SP produziu, em animais, o comportamento de coçar, morder e lambe, indicando nocicepção, e sugerindo que a SP possa ter papel estimulatório importante na via nociceptiva (Awawdeh et al., 2002; Bowles et al., 2003; Caviedes-Bucheli et al., 2006). Assim como encontramos em nossos resultados, nos quais observamos um aumento da expressão de SP após a lesão, percebemos nos animais tratados (Op + PBM) que houve uma diminuição da expressão de SP, demonstrando a regressão da atividade nociceptiva. Com a utilização no mesmo modelo e avaliando a atividade neuronal no gânglio trigeminal, foi demonstrada a efetividade da PBM na diminuição da expressão da substância P nessa estrutura (Sato et al., 2004; Sahbaie et al., 2009; Freitas Rodrigues et al., 2020).

Em nossos resultados de imunoblotting observamos um aumento da expressão de CGRP no grupo de animais operados (Op) quando comparamos com os grupos usados como controle (Naive e Op + PBM). Já no grupo tratado (Op + PBM) visualizamos uma diminuição na expressão de CGRP comparado com os demais grupos, não ocorrendo diferenças significantes entre este e os grupos usados como controle. Outro componente importante no processamento nociceptivo é o peptídeo CGRP que é amplamente expresso no caminho da dor trigeminal, tanto a nível periférico quanto central (Hansen; Ashima, 2014). Foi mostrado que a aplicação de CGRP produz uma excitação lenta e prolongada em neurônios no corno dorsal, que evidencia seu efeito sobre a atividade excitatória neuronal (Yu et al., 2002; Sun et al., 2004; Bird et al., 2006). Sendo que o CGRP também 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).

Nos resultados de imunoblotting podemos observar um aumento na densidade óptica das bandas marcadas para TRPV-1 no disco articular do grupo de animais operados (Op) quando comparado com o grupo controle (Naive). Após o tratamento (Op + PBM) foi observada uma diminuição na expressão de TRPV-1, quando comparado com as bandas dos demais grupos. O 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). Em estudo experimental em ratos foram demonstrados os efeitos do TRPV-1 na mediação da nocicepção muscular craniofacial e hiperalgesia mecânica, com a utilização do músculo masseter (Ro et al., 2009). Na dor orofacial, o TRPV-1 é relatado por estar envolvido na dor da polpa dentária, na dor da DTM e na dor relacionada à lesão do nervo alveolar inferior (Martins et al., 2020). O receptor TRPV1 tem sido citado em muitos estudos que abordaram os mecanismos de nocicepção, por desempenhar um papel essencial no desenvolvimento da dor neuropática induzida por lesão e foi demonstrado que o bloqueio desse receptor resulta em redução da dor em um modelo de ligação do nervo espinal em ratos (Hudson et al., 2001; Luo et al., 2004). Em nossos resultados observamos que a lesão do disco articular levou ao aumento da expressão de TRPV1 sendo que esta regulação foi concomitante com a redução do limiar nociceptivo. Após o tratamento foi observada uma diminuição na expressão de TRPV-1, quando comparado com as bandas dos demais grupos. Somado aos dados de que após os tratamentos houve a reversão do comportamento hipernociceptivo e a redução da expressão proteica de TRPV-1 podemos inferir que este pode estar relacionado com a instalação do quadro hipernociceptivo em nosso modelo.

No que se refere à expressão das citocinas pró-inflamatórias nota-se que houve um aumento significativo após o trauma ao disco articular, havendo uma diminuição significativa diante da PBM, inclusive em níveis menores que o basal (Naive), mostrando um efeito inibitório, pois elas são constitutivas nos tecidos analisados.

Tem sido descrita uma associação entre dor orofacial e ativação de células da glia (Bartolucci et al., 2018; Martins et al., 2020; Ye et al., 2021). Acredita-se que o processo inflamatório intra-articular seja a principal causa de dor em pacientes com DTM, por meio da liberação de citocinas pró-inflamatórias que induzem a

sensibilização periférica dos terminais nervosos seguida de estimulação microglial (Bartolucci et al., 2018). Os mecanismos neurais subjacentes aos achados da dor orofacial indicam que as células não neurais, especificamente as células satélites nos gânglios sensoriais e as células da astroglia e da microglia no sistema nervoso central, são atores importantes nas condições de dor orofacial aguda e crônica, inflamatória e neuropática (Chiang et al., 2011). A possibilidade de ativação de células da glia no núcleo trigeminal ou no núcleo caudal trigeminal diante de vários modelos de DTM em ratos tem sido descrita por Bartolucci et al. (2018) e Ye et al. (2021).

Em nossos resultados de imunoblotting para IL1- β , observamos um aumento da sua expressão no grupo de animais operados (Op) quando comparamos com os grupos usados como controle (Naive e Op + PBM). Já no grupo tratado (Op + PBM) visualizamos uma diminuição significativa na expressão comparado com os demais grupos. Sabe-se que a IL-1 β produz inflamação sistêmica por meio da ativação da ciclooxygenase-2, com a formação de PGE2 desencadeando um quadro inflamatório e no hipotálamo anterior, causando febre. Também produz SP, óxido nítrico e moléculas de adesão endotelial, com importante função no desenvolvimento e na manutenção da dor (Martins et al., 2013). Em nosso estudo vimos que a lesão cirúrgica do disco articular levou a um aumento significativo de sua expressão na ATM (Freitas Rodrigues et al., 2020).

Citocinas liberadas por células gliais ativadas têm papel importante na comunicação neurônio-glial, contribuindo para a transmissão nociceptiva (Martins et al., 2020). A IL1 β liberada pelas células gliais contribui para a hipernocicepção da ATM em ratos (Zhang et al., 2018) e a inibição do TNF- α ou da IL1 β no gânglio trigeminal por inibidores seletivos atenua a alodinia mecânica induzida por lesão do nervo trigêmeo (Zhang et al., 2016). Basicamente, a expressão neuronal de Nav1.7 aumentada de IL-1 β glial no GT contribui para a hipernocicepção inflamatória da ATM (Zhang et al., 2018). Um estudo demonstrou que a utilização do laser de baixa intensidade em um modelo de dor neuropática foi capaz de diminuir o comportamento nociceptivo, os níveis da IL-1 β e reduzir a ativação das células da glia no gânglio da raiz dorsal (Oliveira et al., 2017).

Nos resultados de imunoblotting para IL-6, podemos observar um aumento na densidade óptica das bandas marcadas para IL-6 no disco articular da ATM do grupo de animais operados (Op) quando comparado com os grupos controles (Naive e Op + PBM). Já no grupo tratado (Op + PBM) visualizamos uma diminuição significativa na expressão comparado com os demais grupos. Um estudo sobre dor neuropática com modelo de constrição no nervo oftálmico mostrou após fotobiomodulação e vitaminas B que o aumento das IL-1 β , IL-6 e TNF- α foi seguido de sua regulação (Martins et al., 2020).

Uma das citocinas submetidas à ativação mais forte em muitos processos neuroimunes é a interleucina 6 (IL-6). Após lesão, concentrações plasmáticas de IL-6 são detectáveis em 60 minutos, com pico entre 4 e 6 horas, podendo persistir por 10 dias. em que o aumento excessivo e prolongado está associado a uma morbidade pós-operatória maior (Lin et al., 2000).

Nossos resultados de imunoblotting para TNF- α , no disco articular, revelaram um aumento na densidade óptica das bandas marcadas de animais operados (Op) quando comparado aos grupos controles (Naive e Op + PBM). Após o período de tratamento vimos uma diminuição da expressão de TNF- α em relação aos outros grupos. O TNF α está presente nos neurônios e células da glia, desempenhando funções importantes, tanto na hiperalgesia inflamatória quanto na neuropática. É um dos mediadores mais precoces e potentes da resposta inflamatória. Embora sua meia-vida plasmática seja de apenas 20 minutos, é suficiente para provocar mudanças metabólicas e hemodinâmicas importantes e ativar distalmente outras citocinas (Martins et al., 2013).

Citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 β , IL-6 e TNF- α , geralmente induzem ou facilitam a dor neuropática trazendo inflamação aguda (cascata de citocinas, febre alta, produção de proteína C reativa), em resposta à infecções ou danos no tecido. No tecido periférico estimula a síntese de Prostaglandinas (PGs), especialmente, da Prostaglandina-E2 (PGE2), que leva a sensibilização dos nociceptores aferentes primários induzindo a hiperalgesia inflamatória (Pascoal, 2010), enquanto o bloqueio de citocinas pró-inflamatórias e/ou a administração de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10, reduz a dor neuropática em modelos animais (Batista, 2020).

Em um estudo em um modelo de Inflamação induzida por carragenina nos tecidos da ATM de ratos observou que a fotobiomodulação com laser reduziu significativamente a quantidade de citocinas nos tecidos analisados (TNF- α e IL-1 β), sugerindo uma inibição da quimiotaxia inflamatória, diminuindo a sua expressão. Ao mesmo tempo foi observado aumento da IL-10 que desempenha um papel anti-inflamatório e de diminuição da dor (Mazuquelli Pereira et al., 2021).

A fotobiomodulação tem potencial anti-inflamatório promissor e esses efeitos ocorrem em diferentes mecanismos como nos tecidos, celular e níveis moleculares modulando a resposta inflamatória e promovendo o reparo tecidual. As citocinas são mediadores necessários para conduzir a resposta inflamatória aos locais de infecção e lesão, favorecendo a cicatrização apropriada da ferida. No entanto, a produção exagerada de citocinas pró-inflamatórias a partir da lesão pode manifestar-se sistemicamente com instabilidade hemodinâmica ou distúrbios metabólicos (Oliveira et al., 2011). Nossos resultados em análise histológica demonstraram no grupo Op + PBM uma melhor organização tecidual, com espessamento das fibras colágenas do disco e presença de artérias e arteríolas sugerindo uma neovascularização e uma melhor organização dos tecidos articulares. Por outro lado, na avaliação histomorfométrica, houve uma diminuição da área e perímetro das estruturas avaliadas, o que pode sugerir uma resposta atrófica, embora o fator de forma tenha mostrado um resultado favorável. Um estudo avaliou relação entre o deslocamento cirúrgico experimental do disco e suas mudanças histopatológicas também encontrou achados parecidos no processo inicial do reparo com neoformação vascular e áreas de fibrilação (Ali; Sharawy, 1994). A diminuição da quimiotaxia e por conseguinte a diminuição do infiltrado leucocitário no interior do tecido podem estar relacionados com esses aspectos de melhora tecidual observados após a fotobiomodulação com uso de (lasers), pois a imigração excessiva está muito relacionada com os aspectos de inflamação crônica e com a lesão tecidual (Yadav; Gupta, 2017).

Alguns estudos mostraram que o trauma cirúrgico na ATM pode levar a alterações celulares e extracelulares no disco, zona bilaminar, côndilo, eminência articular e membrana sinovial (Luz et al., 1991; Ali; Sharawy, 1994). Nossos resultados no histomorfométrico mostram algumas mudanças. Observamos ao mensurar a área do disco, que no grupo Op + PBM houve diferença estatística significativa quando comparado aos grupos controle (naive e Op + PBM), essa alteração sugere que o trauma provocou uma diminuição da área do disco.

É sabido que o trauma pode causar alterações composição tecidual e na biomecânica dos tecidos retrodiscais (Cooper et al., 1999). Nossos resultados de análise histomorfétrica na área do espaço articular inferior revelaram uma diferença estatística significativa entre animais operados e Irradiados (Op + PBM) quando comparado ao grupo controle (Naive). Uma diminuição do espaço articular foi demonstrada experimentalmente diante do trauma indireto à ATM (Luz et al., 1991). Esse menor espaço sugere uma resposta atrófica e degenerativa em relação ao trauma nesse grupo.

As condições patológicas intra-articulares estão associadas a mudanças qualitativas e quantitativas na vários componentes nos tecidos intra-articulares (Bouloux, 2018). A diminuição da expressão de Subst P, CGRP e TRVP-1, mostrou um aumento na expressão após a lesão experimental, gerando comportamento nociceptivo no animal e uma diminuição de sua expressão após a fotobiomodulação mostrando uma melhora no quadro nociceptivo (Freitas Rodrigues et al., 2020).

Ao analisar a expressão dentro dos tecidos moles da articulação das das citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-1b e Tnf-a observamos um aumento de sua expressão após o trauma cirúrgico, gerando aumento do comportamento nociceptivo e uma diminuição com o uso da fotobiomodulação (Freitas Rodrigues et al., 2020). Assim é possível afirmar que a fotobiomodulação foi capaz de atuar no controle da dor e do processo inflamatório, contribuindo para a reparação tecidual.

7 CONCLUSÕES

Com este trabalho, que analisou os efeitos da fotobiomodulação na atividade nociceptora e na expressão de citocinas pró-inflamatórias no disco da ATM após lesão unilateral em ratos, foi possível concluir que:

Houve aumento da expressão da substância P (SP), do receptor de potencial transiente vaniloide do subtipo 1 (TRPV-1) e do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) após a lesão e uma diminuição de sua respectiva expressão após a PBM.

Houve aumento da expressão da Interleucina 6 (IL-6), Interleucina 1beta (IL1- β) e do Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) após a lesão e uma diminuição de sua respectiva expressão após a PBM.

A PBM levou a um melhor reparo tecidual na região do disco articular, embora tenhamos avaliado apenas uma fase do processo de reparo.

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. doi: 10.1002/(sici)1096-9101(2000)26:4<357::aid-lsm3>3.0.co;2-o.

Aghabeigi B. The pathophysiology of pain. *Br Dent J.* 1992 Aug;173(3): 91-7. doi: 10.1038/sj.bdj.4807944.

Albrektsson T, Hansson HA. An ultrastructural characterization of the interface between bone and sputtered titanium or stainless steel surfaces. *Biomaterials.* 1986, May;7(3):201-5. doi: 10.1016/0142-9612(86)90103-1.

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. doi: 10.1111/j.1600-0714.1994.tb00077.x.

Amaya F, Oh-hashii K, Naruse Y, Iijima N, Ueda M, Shimosato G, et al. Local inflammation increases vanilloid receptor 1 expression within distinct subgroups of DRG neurons. *Brain Res.* 2003 Feb;963(1-2):190-6. doi: 10.1016/s0006-8993(02)03972-0.

Amorim JC, Sousa GR, Barros Silveira L, Prates RA, Pinotti M, Ribeiro MS. Clinical study of the gingival healing after gingivectomy and low-level laser therapy. *Photomed Laser Surg.* 2006;Oct;24(5): 588-94. doi: 10.1089/pho.2006.24.588.

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. doi: 10.1046/j.1365-2591.2002.00451.x.

Axelsson S, Holmlund A, Hjerpe A. An experimental model of osteoarthritis in the temporomandibular joint of the rabbit. *Acta Odontol Scand.* 1992 Oct;50(5):273-80. doi: 10.3109/00016359209012773.

Bacelete VSB, Gama ACC. Efeitos terapêuticos da fotobiomodulação na clínica fonoaudiológica: uma revisão integrativa da literatura. *Rev CEFAC.* 2021;23(1):e9120. doi: 10.1590/1982-0216/20212319120.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

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 Oct;478(1):62-71. doi: 10.1002/cne.20272.

Barretto SR, Melo GC, Santos JC, Oliveira MG, Pereira-Filho RN, Alves AV, et al. 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;129:135-42. doi: 10.1016/j.photobiol.2013.10.002.

Bartolucci ML, Marini I, Bortolotti F, Impellizzeri D, Di Paola R, Bruschetta G, et al. Micronized palmitoylethanolamide reduces joint pain and glial cell activation. *Inflamm Res*. 2018 Oct;67(10):891-901. doi: 10.1007/s00011-018-1179-y.

Batista KZS. Notas de aula, 2020. Projetor digital.

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 26;2:31. doi: 10.1186/1744-8069-2-31.

Bjørnland T, Haanaes HR. Discectomy of the temporomandibular joint: an experimental study in monkeys. *J Craniomaxillofac Surg*. 1999 Apr;27(2):113-6. doi: 10.1016/s1010-5182(99)80024-9.

Bonjardim LR, 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. doi: 10.1016/j.pbb.2008.08.001.

Bouloux GF. The Use of Synovial Fluid Analysis for Diagnosis of Temporomandibular Joint Disorders. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*. 2018 Aug;30(3):251-6. doi: 10.1016/j.coms.2018.03.001.

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. doi: 10.1097/00004770-200304000-00009.

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. doi: 10.1016/j.pain.2005.02.010.

Calvo M, Dawes JM, Bennett DL. The role of the immune system in the generation of neuropathic pain. *Lancet Neurol*. 2012 Jul;11(7):629-42. doi: 10.1016/S1474-4422(12)70134-5.

Carvalho CM, Lacerda JA, Santos Neto FP, Castro IC, Ramos TA, Lima FO, et 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, et al. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science*. 2000 Apr;288(5464):306-13. doi: 10.1126/science.288.5464.306.

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. doi: 10.1111/j.1365-2591.2006.01093.x.

Chacur M, Lambert 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. doi: 10.1016/j.ejpain.2008.11.008.

Chagas LR, Silva Jr JA, 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 FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods*. 1994 Jul;53(1): 55-63. doi: 10.1016/0165-0270(94)90144-9.

Chiang CY, Dostrovsky JO, Iwata K, Sessle BJ. Role of glia in orofacial pain. *Neuroscientist*. 2011 Jun;17(3):303-20. doi: 10.1177/1073858410386801.

Chidiac JJ, Rifai K, Hawwa NN, Massaad CA, Jurjus AR, Jabbur SJ, et al. 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. doi: 10.1053/eujp.2001.0305.

Cooper B, Oberdorfer M, Rumpf D, Malakhova O, Rudman R, Mariotti A. Trauma modifies strength and composition of retrodiscal tissues of the goat temporomandibular joint. *Oral Dis*. 1999 Oct;5(4):329-36. doi: 10.1111/j.1601-0825.1999.tb00099.x.

Davis JB, Gray J, Gunthorpe MJ, Hatcher JP, Davey PT, Overend P, et al. Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature*. 2000 May; 405(6783):183-7. doi: 10.1038/35012076.

de Bont LG, Dijkgraaf LC, Stegenga B. Epidemiology and natural progression of articular temporomandibular disorders. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1997 Jan;83(1):72-6. doi: 10.1016/s1079-2104(97)90094-9.

De Kanter RJ, Truin GJ, Burgersdijk RC, Van 't Hof MA, Battistuzzi PG, Kalsbeek H, et al. 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. doi: 10.1177/00220345930720110901.

Denadai-Souza A, Camargo L de L, Ribela MT, Keeble JE, Costa SK, Muscará MN. Participation of peripheral tachykinin NK1 receptors in the carrageenan-induced inflammation of the rat temporomandibular joint. *Eur J Pain*. 2009 Sep;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.

Ernberg M. The role of molecular pain biomarkers in temporomandibular joint internal derangement. *J Oral Rehabil*. 2017 Jun;44(6):481-91. doi: 10.1111/joor.12480.

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. doi: 10.1002/jnr.22613.

Freitas PM, Simões A, editors. *Lasers in dentistry: guide for clinical practice*. USA: Wiley-Blackwell; 2015. doi:10.1002/9781118987742.

Freitas Rodrigues A, de Oliveira Martins D, Chacur M, Luz JGC. The effectiveness of photobiomodulation in the management of temporomandibular pain sensitivity in rats: behavioral and neurochemical effects. *Lasers Med Sci.* 2020 Mar;35(2):447-53. doi: 10.1007/s10103-019-02842-0.

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, et al. A repetitive, steady mouth opening induced an osteoarthritis-like lesion in the rabbit temporomandibular joint. *J Dent Res.* 2003 Sep;82(9):731-5. doi: 10.1177/154405910308200914.

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. doi: 10.1016/s0304-3959(02)00067-2.

Gal P, Mokry M, Vidinsky B, Kilik R, Depta F, Harakalova M, et al. 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, et al. Attenuation of thermal nociception and hyperalgesia by VR1 blockers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(4):2374-9. doi: 10.1073/pnas.022285899.

Gesch D, Bernhardt O, Mack F, John U, Kocher T, Alte D. [Dental occlusion and subjective temporomandibular joint symptoms in men and women. Results of the Study of Health in Pomerania (SHIP)]. *Schweiz Monatsschr Zahnmed.* 2004;114(6):573-80.

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. doi: 10.1590/s1806-83242005000200005.

Gregersen R, Lambertsen K, Finsen B. Microglia and macrophages are the major source of tumor necrosis factor in permanent middle cerebral artery occlusion in mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2000 Jan;20(1):53-65. doi: 10.1097/00004647-200001000-00009.

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 Aug;34(9):695-707. doi: 10.1177/0333102413520084.

Hosgor H. The relationship between temporomandibular joint effusion and pain in patients with internal derangement. *J Craniomaxillofac Surg*. 2019 Jun;47(6):940-944. doi: 10.1016/j.jcms.2019.03.010.

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. doi: 10.1046/j.0953-816x.2001.01591.x.

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. doi: 10.1016/s0003-9969(99)00129-6.

Israel HA. Internal derangement of the temporomandibular joint: new perspectives on an old problem. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*. 2016 Aug;28(3):313-33. doi: 10.1016/j.coms.2016.03.009.

Jacobs R, Wu CH, Van Loven K, Desnyder M, Kolenaar B, Van Steenbergred D. Methodology of oral sensory tests. *J Oral Rehabil* 2002 Aug;29(8):720-30. doi: 10.1046/j.1365-2842.2002.00952.x.

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. doi: 10.1016/j.neuropharm.2005.05.003.

Karu T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *J Photochem Photobiol B*. 1999 Mar;49(1):1-17. doi: 10.1016/S1011-1344(98)00219-X.

Kido MA, Kiyoshima T, Kondo T, Ayasaka N, Moroi R, Terada Y, Tanaka T. Distribution of substance P and calcitonin gene-related peptide-like immunoreactive nerve fibers in the rat temporomandibular joint. *J Dent Res*. 1993 Mar;72(3):592-8. doi: 10.1177/00220345930720030701.

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 Mar;9(3):280-8. doi: 10.1016/j.jpain.2007.11.013.

Kim SH, Son CN, Lee HJ, Cho HC, Jung SW, Hur JA, et al. Infliximab partially alleviates the bite force reduction in a mouse model of temporomandibular joint pain. *J Korean Med Sci*. 2015 May;30(5):552-8. doi: 10.3346/jkms.2015.30.5.552.

Kramer PR, Kerins CA, Schneiderman E, Bellinger LL. Measuring persistent temporomandibular joint nociception in rats and two mice strains. *Physiol Behav*. 2010 Apr;99(5):669-78. doi: 10.1016/j.physbehv.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. doi: 10.1016/s0301-0082(01)00021-1.

Lazarov NE. The mesencephalic trigeminal nucleus in the cat. *Adv Anat Embryol Cell Biol*. 2000; 153:iii-xiv, 1-103. doi: 10.1007/978-3-642-57176-3.

Lemos GA, Rissi R, de Souza Pires IL, de Oliveira LP, de Aro AA, Pimentel ER, et al. 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. doi: 10.1016/s0363-5023(78)80084-7.

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 E, Calvano SE, Lowry SF. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. *Surgery*. 2000 Feb;127(2):117-26. doi: 10.1067/msy.2000.101584.

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. doi: 10.1186/1744-8069-3-30.

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. doi: 10.1097/00001756-200403220-00016.

Luz JG, Jaeger RG, de Araújo VC, de Rezende JR. The effect of indirect trauma on the rat temporomandibular joint. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1991 Feb;20(1):48-52. doi: 10.1016/s0901-5027(05)80697-6.

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. doi: 10.1179/0886963413Z.0000000004.

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

Martins DO, Marques DP, Venega RAG, Chacur M. Photobiomodulation and B vitamins administration produces antinociception in an orofacial pain model through the modulation of glial cells and cytokines expression. *Brain Behav Immun Health*. 2020 Jan 26;2:100040. doi: 10.1016/j.bbih.2020.100040.

Martins DO, Santos FM, Britto LR, Lemos JB, Chacur M. Neurochemical effects of photobiostimulation in the trigeminal ganglion after inferior alveolar nerve injury. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2017 Jan-Mar;31(1):147-52.

Martins DO, Santos FM, Oliveira ME, Britto LRG, Lemos JBD, Chacur M. Laser therapy and pain-related behavior after injury of the inferior alveolar nerve: possible involvement of neurotrophins. *J Neurotrauma*. 2013 Mar;30(6):480-6. doi: 10.1089/neu.2012.2603.

Mazuqueli Pereira ESB, Basting RT, Abdalla HB, Garcez AS, Napimoga MH, Clemente-Napimoga JT. Photobiomodulation inhibits inflammation in the temporomandibular joint of rats. *J Photochem Photobiol B*. 2021 Sep;222:112281. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2021.112281.

Merrill RL. Central mechanisms of orofacial pain. *Dent Clin North Am*. 2007 Jan;51(1):45-59. doi: 10.1016/j.cden.2006.09.010.

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. doi: 10.1067/moe.2002.119518.

Minakuchi H, Kuboki T, Matsuka Y, Maekawa K, Yatani H, Yamashita A. Randomized controlled evaluation of non-surgical treatments for temporomandibular joint anterior disk displacement without reduction. *J Dent Res*. 2001 Mar;80(3):924-8. doi: 10.1177/00220345010800031501.

Mohl ND. A articulação temporomandibular. In: Mohl ND, Zarb GA, Carlsson GE, Rugh JD. *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. doi: 10.1002/lsm.20117.

Murphy K. *Imunobiologia de Janeway*. 8. ed. Porto Alegre: Artmed; 2014.

Nagamine K, Ozaki N, Shinoda M, Asai H, Nishiguchi H, Mitsudo K, et al. Mechanical allodynia and thermal hyperalgesia induced by experimental squamous cell carcinoma of the lower gingiva in rats. *J Pain*. 2006 Sep;7(9):659-70. doi: 10.1016/j.jpain.2006.02.013.

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 [dissertação]*. 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. doi: 10.1016/s0006-8993(00)02440-9.

Obata K, Yamanaka H, Kobayashi K, Dai Y, Mizushima T, Katsura H, et al. 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 Nov;24(45):10211-22. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3388-04.2004.

Ogus HD, Toller PA. *Common disorders of the temporomandibular joint.* Bristol: Dental Practitioner Handbook; 1981.

Okeson JP. *Tratamento das desordens temporomandibulares e oclusão.* 7a ed. Rio de Janeiro: Mosby Elsevier; 2013. p. 154-5.

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.

Oliveira CMB, Sakata RK, Issy AM, Gerola LR, Salomão R. Citocinas e dor. *Rev Bras Anestesiol.* 2011 mar-abr;61(2):255-65.

Oliveira ME, Santos MF, Bonifácio RP, Freitas MF, Martins DO, Chacur M. Low level laser therapy alters satellite glial cell expression and reverses nociceptive behavior in rats with neuropathic pain. *Photochem Photobiol Sci.* 2017 Apr;16(4):547-54. doi: 10.1039/C6PP00360E.

Pascoal VDB. *O papel da interleucina-1-beta na fase aguda do modelo de epilepsia do lobo temporal induzido pela pilocarpina [tese].* Campinas: Faculdade de Ciências Médicas; 2010.

Pereira TS, Flecha OD, Guimarães RC, de Oliveira D, Botelho AM, Ramos Glória JC, et al. 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. doi: 10.1179/0886963413Z.0000000005.

Pietrobon D, Striessnig J. Neurobiology of migraine. *Nat Rev Neurosci*. 2003 May;4(5):386-98. doi: 10.1038/nrn1102.

Piette E. Anatomy of the human temporomandibular joint. An updated comprehensive review. *Acta Stomatol Belg*. 1993 Jun;90(2):103-27.

Poluha RL, Grossmann E. Inflammatory mediators related to arthrogenic temporomandibular dysfunctions. *Br J Pain*. São Paulo, 2018 jan-mar;1(1):60-5. <https://doi.org/10.5935/2595-0118.20180013>.

Pomonis JD, Harrison JE, Mark L, Bristol DR, Valenzano KJ, Walker K. N-(4-Tertiarybutylphenyl)-4-(3-cholorphyrudin-2-yl)tetrahydropyrazine -1(2H)-carbox-amide (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. doi: 10.1124/jpet.102.046268.

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

Raja SN, Carr DB, Cohen M, Finnerup NB, Flor H, Gibson S, et al. The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. *Pain*. 2020 Sep 1;161(9):1976-1982. doi: 10.1097/j.pain.0000000000001939.

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. doi: 10.1124/jpet.102.046250.

Ren K, Dubner R. Interactions between the immune and nervous systems in pain. *Nat Med*. 2010 Nov;16(11):1267-76. doi: 10.1038/nm.2234.

Ribeiro MS, Zezell DM. Laser em baixa intensidade. In: Gutknecht N, Eduardo CP. A odontologia e o laser, a atuação do laser na especialidade odontológica. São Paulo: Quintessence; 2004. p. 217-40.

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

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. doi: 10.1089/pho.2007.2093.

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. doi: 10.1002/lsm.1041.

Rodrigues AF, Kondo CA, Procópio AFS, Luz JGC. Helkimo and Craniomandibular Indices in the Classification of Temporomandibular Disorders. A comparative study. *MYOPAIN.* 2016;23(3-4):94-9. doi:10.1080/24708593.2016.1251999.

Sahbaie P, Shi X, Guo TZ, Qiao Y, Yeomans DC, Kingery WS, et al. Role of substance P signaling in enhanced nociceptive sensitization and local cytokine production after incision. *Pain.* 2009 Oct;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. doi: 10.1159/000086200.

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. doi: 10.2174/0929866511320060002.

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. doi: 10.1016/j.tripleo.2004.02.057.

Sato J, Segami N, Yoshitake Y, Kaneyama K, Abe A, Yoshimura H, et al. 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. doi: 10.1016/j.tripleo.2005.03.008.

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. *Oral Maxillofac Surg.* 1998 Jun;56(6):753-8; discussion 758-9. doi: 10.1016/s0278-2391(98)90813-8.

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.

Schaible HG, Ebersberger A, Von Banchet GS. Mechanisms of pain in arthritis. *Ann N Y Acad Sci.* 2002;966:343-54.

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. doi: 10.1177/10454411000110010401.

Sessle B, Bryant PS, Dionne RA, editors. Temporomandibular disorders and related pain conditions. Seattle: IASP Press; 1995. (Progress in pain research and management, v. 4).

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;17(2):133-7;discussion 8. doi: 10.1055/s-2001-12702.

Shankland WE 2nd. The trigeminal nerve. Part I: An over-view. *Cranio.* 2000 Oct;18(4):238-48. doi: 10.1080/08869634.2000.11746137.

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

Sommer C, Kress M. Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. *Neurosci Lett.* 2004 May 6;361(1-3):184-7. doi: 10.1016/j.neulet.2003.12.007.

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.* 2004 Nov;92(5):2859-66. doi: 10.1152/jn.00339.2004.

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.

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.* 2004 Nov;92(5):2859-66. doi: 10.1152/jn.00339.2004.

Sydney PBH, Conti PCR. Diretrizes para avaliação somatossensorial em pacientes portadores de disfunção temporomandibular e dor orofacial. *Rev Dor.* 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. doi: 10.1016/s0278-2391(96)90355-9.

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.* 2005 Aug;116(3):375-85. doi: 10.1016/j.pain.2005.05.007.

Tanaka E, Detamore MS, Mercuri LG. Degenerative disorders of the temporomandibular joint: etiology, diagnosis, and treatment. *J Dent Res.* 2008 Apr;87(4):296-307. doi: 10.1177/154405910808700406.

Tarsa L, Bałkowiec-Iskra E, Kratochvil FJ 3rd, Jenkins VK, McLean A, Brown AL, et al. Tooth pulp inflammation increases brain-derived neurotrophic factor expression in rodent trigeminal ganglion neurons. *Neuroscience.* 2010 Jun 2;167(4):1205-15. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.03.002.

Tizard IR. *Imunologia veterinária: uma introdução.* 9. ed. São Paulo: Saunders Elsevier; 2009. p. 174-5.

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 Mar;130(3):289-94. Japanese. doi: 10.1248/yakushi.130.289.

Usunoff KG, Marani E, Schoen JH. The trigeminal system in man. *Adv Anat Embryol Cell Biol.* 1997;136:I-X, 1-126. doi: 10.1007/978-3-642-60779-0.

Valle RT, Grossmann E, Fernandes RSM. *Disfunções temporomandibulares: abordagem clínica.* São Paulo: Napoleão; 2015. p. 80-102.

Von Korff M, Galer BS, Stang P. Chronic use of symptomatic headache medications. *Pain.* 1995 Aug;62(2):179-186. doi: 10.1016/0304-3959(94)00263-E.

Waite PM, Ashwell KW. 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, et al. The VR1 antagonist capsazepine reverses mechanical hyperalgesia in models of inflammatory and neuropathic pain. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003 Jan;304(1):56-62. doi: 10.1124/jpet.102.042010.

Wieckiewicz M, Shiau YY, Boening K. Pain of temporomandibular disorders: from etiology to management. *Pain Res Manag.* 2018 Jun 20;2018:4517042. doi: 10.1155/2018/4517042.

Xu JT, Xin WJ, Zang Y, Wu CY, Liu XG. The role of tumor necrosis factor-alpha in the neuropathic pain induced by Tanaka mbar 5 ventral root transection in rat. *Pain.* 2006 Aug;123(3):306-21. doi: 10.1016/j.pain.2006.03.011.

Yadav A, Gupta A. Noninvasive red and near-infrared wavelength-induced photobiomodulation: promoting impaired cutaneous wound healing. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2017 Jan;33(1):4-13. doi: 10.1111/phpp.12282.

Ye Y, Salvo E, Romero-Reyes M, Akerman S, Shimizu E, Kobayashi Y, et al. Glia and orofacial pain: progress and future directions. *Int J Mol Sci.* 2021 May 19;22(10):5345. doi: 10.3390/ijms22105345.

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.* 2002 Jan;103(1):23-7. doi: 10.1016/s0167-0115(01)00326-3.

Zhang H, Cang CL, Kawasaki Y, Liang LL, Zhang YQ, Ji RR, et al. Neurokinin-1 receptor enhances TRPV1 activity in primary sensory neurons via PKCepsilon: a novel pathway for heat hyperalgesia. *J Neurosci*. 2007 Oct;27(44):12067-77. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0496-07.2007.

Zhang P, Bi RY, Gan YH. Glial interleukin-1 β upregulates neuronal sodium channel 1.7 in trigeminal ganglion contributing to temporomandibular joint inflammatory hypernociception in rats. *J Neuroinflammation*. 2018 Apr;15(1):117. doi: 10.1186/s12974-018-1154-0.

Zhang P, Tsuchiya K, Kinoshita T, Kushiya H, Suidasari S, Hatakeyama M, et al. Vitamin B6 Prevents IL-1 β Protein Production by Inhibiting NLRP3 Inflammasome Activation. *J Biol Chem*. 2016 Nov;291(47):24517-27. doi: 10.1074/jbc.M116.743815.

Zhou YQ, Liu Z, Liu ZH, Chen SP, Li M, Shahveranov A, et al. Interleukin-6: an emerging regulator of pathological pain. *J Neuroinflammation*. 2016 Jun;13(1):141. doi: 10.1186/s12974-016-0607-6.

ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa Animal da FOUSP

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA**

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

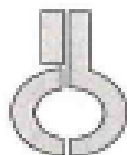
Certificado

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

ANEXO B - Parecer do comitê de ética em pesquisa animal do ICB III- USP



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 3415 – 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 LERIOUQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP