

Daniel Tiago Barbosa

**ANÁLISE FARMACOLÓGICA E COMPORTAMENTAL DE UM
MODELO DE OSTEOARTRITE POR INJEÇÃO DE
IODOACETATO MONOSSÓDICO NA ARTICULAÇÃO
TEMPOROMANDIBULAR DE RATOS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Rogério Tonussi.

Florianópolis
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Barbosa, Daniel Tiago

Análise farmacológica e comportamental de um modelo de osteoartrite por injeção de iodoacetato monossódico na articulação temporomandibular de ratos / Daniel Tiago Barbosa ; orientador, Carlos Rogério Tonussi - Florianópolis, SC, 2015.
149 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Osteoartrite. 3. Iodoacetato monossódico. 4. ATM. 5. Comportamento nociceptivo. I. Tonussi, Carlos Rogério . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

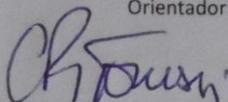
“Análise farmacológica e comportamental de modelo de osteoartrite por injeção de iodoacetato monossódico na articulação temporomandibular de ratos”

Por

Daniel Tiago Barbosa

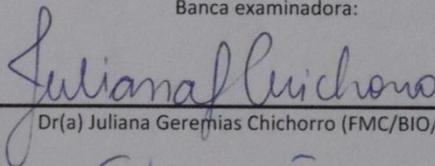
Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (006/FMC/UFSC) do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia – UFSC, composta pelos doutores:

Orientador:

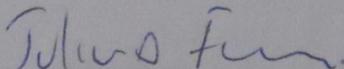


Dr(a) Carlos Rogério Tonussi (FMC/CCB/UFSC)

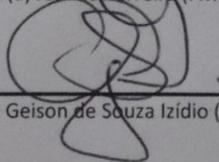
Banca examinadora:



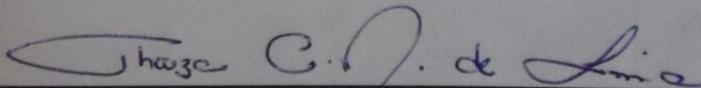
Dr(a) Juliana Geremias Chichorro (FMC/BIO/UFPR)



Dr(a) Juliano Ferreira (FMC/CCB/UFSC)



Dr(a) Geison de Souza Izídio (BEG/CCB/UFSC)



Prof(a). Dr(a). Thereza Christina Monteiro de Lima
Coordenador(a) do Programa de Pós Graduação em Farmacologia

Florianópolis, 9 de abril de 2015.

Este trabalho é dedicado aos meus queridos pais, José e Nilce, meus maiores incentivadores.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu caro orientar Professor Dr. Carlos Rogério Tonussi, pela oportunidade e confiança depositada em mim, permitindo que eu crescesse não só como pessoa e profissional, mas que também desse os primeiros passos na pesquisa, percebendo que a ciência era o que faltava para minha realização profissional.

Aos Professores Drs. Geison de Souza Izídio, Juliano Ferreira, Rui Prediger e Juliana G. Chichorro, por aceitarem compor a banca desse trabalho e contribuir não só para a estruturação do mesmo, mas também para o meu crescimento como aluno e pesquisador.

Aos colegas de laboratório: Vanessa, Taciane, Felipe, Lucas, Maíra, Alessandra, Débora e Elba pelo conhecimento compartilhado e por toda ajuda dada. Em especial à Msc. Flora L. Sant'ana pela contribuição não só com conhecimento, mas também pela realização das cirurgias de vagotomia.

Aos demais professores e colegas do Departamento de Farmacologia, pela contribuição e pelos ensinamentos, carregados com muito apreço e carinho. Em especial à Dra. Lenyta Oliveira Gomes pelo conhecimento e técnicas compartilhadas.

Ao Laboratório de Genética do Comportamento por disponibilizar material essencial para execução dos experimentos de ingesta alimentar.

Aos funcionários do departamento e do biotério, pela colaboração. Em especial aos funcionários do Lameb II, Demétrio, Chirle e Emily.

Agradeço aos amigos que o mestrado presenteou-me: Fernanda, Renata, Elisa, Giovana, Erick, Elaine e Natalli. Obrigado pelo apoio e ajuda incondicional, seja com boas risadas ou com conhecimento, que vocês têm de sobra. Levo para vida, com muito carinho, a amizade sincera que tenho por cada um.

Em especial, aos meus pais que sempre estiveram ao meu lado, apoiando toda decisão e contribuindo da melhor forma que podiam. Meus sinceros agradecimentos. Aos amigos que ficaram nos pampas. Em especial aos amigos Lenilton, Adrean, Iolanda, Carú e Giulliano, pessoas muito especiais.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

RESUMO

Entre as patologias que acometem a articulação temporomandibular (ATM), a doença articular degenerativa, ou osteoartrite (OA), constitui-se a mais comum. Estima-se que 10% da população mundial com idade acima de 60 anos sofre de algum tipo de dor associada à OA, sendo considerada uma doença relacionada à idade. Entre gêneros, sua prevalência apresenta proporções acima de 2:1 para mulheres. Dessa maneira, o presente trabalho teve por objetivo avaliar comportamental e farmacologicamente a eficácia do composto iodoacetato monossódico (MIA) injetado na ATM de ratos. A injeção bilateral (50 µl) de MIA foi aplicada no compartimento superior da ATM dos animais. Para avaliar alterações nociceptivas e funcionais, procederam-se testes de observação comportamental nociceptiva (OCN) e ingesta alimentar (IA). Inicialmente, realizou-se uma curva dose-resposta do MIA (doses de 0,5; 1; 2 e 3 mg) para padronização da dose capaz de reproduzir alterações nociceptivas e funcionais na articulação durante 21 dias. A dose de 0,5 mg de MIA foi a menor dose responsiva capaz de sustentar as alterações durante todo o protocolo e demonstrar características crônicas do modelo. Para validação farmacológica do modelo, tratamentos utilizando fármacos mais comuns para dor da OA temporomandibular foram realizados no sétimo dia após injeção do MIA: dexametasona (2,5; 4 e 6 mg/kg, i.p.); naproxeno (30,9 e 61,8 mg/kg, v.o.); celecoxibe (6,3; 12,6 e 25,1 mg/kg, v.o.); paracetamol (30 e 45 mg/kg, v.o.); morfina (1, 2 e 4 mg/kg, i.p.); amitriptilina (1,5 e 10,8 mg/kg, i.p.). Além destes, como proposta experimental, avaliou-se a tripsina (0,75; 1,5; 2,95 e 6 mg/kg, v.o.). Os mesmos foram testados quanto a sua capacidade analgésica nos testes de OCN e IA. Os fármacos dexametasona (4,6 mg/kg), paracetamol (30 mg/kg), morfina (4 mg/kg), amitriptilina (10,8 mg/kg) e tripsina (1,5 mg/kg) foram capazes de alterar para padrões positivos todos os comportamentos observados (coçar com a pata traseira, chacoalhar de cabeça, repousar/dormir e mastigar). Contudo, os AINES celecoxibe (12,6 mg/kg) e naproxeno (30,9 mg/kg) foram capazes de reduzir apenas o tempo do comportamento de mastigar e o número de chacoalhadas de cabeça. Em relação ao teste de IA, somente a dexametasona e o paracetamol não elevaram a quantidade de ração ingerida pelos animais. Ainda, a vagotomia subdiafragmática foi capaz

de inibir a ação da tripsina (1,5 mg/kg, v.o.) sobre os testes nociceptivos, sugerindo uma relação entre nervo vago e a atividade da protease. Em suma, a injeção de MIA na ATM levou a alterações comportamentais nociceptivas, bem como prejuízo funcional da articulação durante 21 dias, além de responder à abordagem farmacológica comum da OA, revelando perfil semelhante à patologia humana e, dessa forma, constituindo-se promissor e consistente modelo para estudo da OA na ATM.

Palavras-chave: Comportamento nociceptivo, ingesta alimentar, tripsina, vagotomia.

ABSTRACT

The degenerative joint disease, also known as osteoarthritis (OA), is among the most common pathologies affecting the temporomandibular joint (TMJ). Around 10% of worldwide people over 60 years suffer from some pain related to OA and, therefore, it is considered an age-related disease. Among genders, its prevalence shows ratios over 2:1 for women. Therefore, this study aimed to evaluate pharmacological and behaviorally the effectiveness of monosodium iodoacetate compound (MIA) injection into TMJ of rats. Bilateral MIA-injection (50 μ l) was applied into the TMJ upper compartment. To assess nociceptive and functional changes, nociceptive behavioral observation (NBO) and food intake (FI) tests were conducted. Initially, to evaluate the lowest dose capable of reproducing joint nociceptive and functional changes, a dose-response curve (0.5, 1, 2 e 3 mg/kg) was performed throughout 21 days. MIA 0.5 mg dose was the lowest responsive dose, holding the changes throughout entire protocol and demonstrating chronic features of the model. Thus, for pharmacological validation of the MIA model as TMJ-OA inducer, the most common drugs to OA pain treatment were assessed on day 7th after MIA injection: dexamethasone (2.5, 4 e 6 mg/kg, i.p.); naproxen (30.9 e 61.8 mg/kg, p.o.); celecoxib (6.3, 12.6 e 25.1 mg/kg, p.o.); paracetamol (30 e 45 mg/kg, p.o.); morphine (1, 2 e 4 mg/kg, i.p.); amitriptyline (1.5 e 10.8 mg/kg, i.p.). Addition to these, as an experimental proposal, trypsin (0.75, 1.5, 2.95 e 6 mg/kg, p.o.) was assayed. The drugs were assessed regarding their analgesic power in the NBO and FI tests. The drugs dexamethasone (4.6 mg/kg) paracetamol (30 mg/kg), morphine (4 mg/kg), amitriptyline (10.8 mg/kg) and trypsin (1.5 mg/kg) were able to change to positive patterns all observed behaviors (scratching, head flinching, rest/sleep and chewing-like). However, NSAID celecoxib (12.6 mg/kg) and naproxen (30.9 mg/kg) were able to reduce only chewing-like behavior and the number of head flinchings. Regarding the FI test, only acetaminophen and dexamethasone did not improve the amount of food taken by animals. Furthermore, the subdiaphragmatic vagotomy was capable of inhibiting the trypsin action on nociceptive tests, suggesting a relationship between vagus nerve and trypsin activity. In summary, TMJ MIA-injection led to nociceptive behavioral changes, as

well as joint functional impairment throughout 21 days, besides of answering to common pharmacological approach of OA, revealing similar profile to human pathology and, thereby, becoming a promising and consistent model for TMJ-OA study.

Keywords: Nociceptive behavior, food intake, trypsin, vagotomy.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Esquema anatômico da articulação temporomandibular. 21
- Figura 2:** Esquema anatômico da porção subdiafragmática do nervo vago e seus ramos no rato. 30
- Figura 3:** Representação esquemática das alterações morfológicas provocadas por doença inflamatória e degenerativa em complexos articulares..... 38
- Figura 4:** Esquema do sítio e confirmação da injeção do MIA. 57
- Figura 5:** Ilustração dos comportamentos nociceptivos espontâneos analisados..... 59
- Figura 6:** Desenho experimental geral. 62
- Figura 7:** Avaliação temporal da ingesta alimentar do Protocolo 1..... 66
- Figura 8:** Perfil temporal da injeção intra-articular de diferentes doses de MIA na ATM (Protocolo 1 - Coçar e Chacoalhar)..... 67
- Figura 9:** Perfil temporal da injeção intra-articular de diferentes doses de MIA na ATM (Protocolo 1 – Repousar/Dormir e Mastigar)..... 68
- Figura 10:** Perfil temporal da injeção intra-articular da dose de 0,5mg de MIA na ATM sem teste de IA precedendo os testes de OCN (Protocolo 2 – coçar e chacoalhar)..... 70
- Figura 11:** Perfil temporal da injeção intra-articular da dose de 0,5 mg de MIA na ATM sem teste de IA precedendo os testes de OCN (Protocolo 2)..... 71
- Figura 12:** Avaliação temporal da ingesta alimentar (Protocolo 2). 72
- Figura 13:** Efeito da dexametasona sobre os testes de OCN e IA. 74

Figura 14: Efeito da morfina sobre os testes de OCN e IA.....	76
Figura 15: Efeito do paracetamol sobre os testes de OCN e IA.....	78
Figura 16: Efeito do naproxeno sobre os testes de OCN e IA.....	80
Figura 17: Efeito do celecoxibe sobre os testes de OCN e IA.	82
Figura 18: Efeito da amitriptilina sobre os testes de OCN e IA.....	84
Figura 19: Efeito da tripsina sobre os testes de OCN e IA.	86
Figura 20: Bloqueio da tripsina v.o. pela vagotomia nos testes de OCN e IA.	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação das DTMs.....	35
Tabela 2: Drogas utilizadas nos protocolos.	56
Tabela 3: Sumarização de resultados	89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA – Ácido araquidônico
AINES – Anti-inflamatórios não-esteroidais
ATM – Articulação temporomandibular
CDR – Curva dose-resposta
CFA – Adjuvante completo de Freund
CGRP – Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CLVM – Área caudal ventrolateral da medula oblonga
CME – Componentes da matriz extracelular
COX – Cicloxigenase
DTM – Desordem Temporomandibular
i.p. – Intraperitoneal
IA – Ingesta alimentar
IL-1 – Interleucina 1
IL-6 – Interleucina 6
LC – *Locus Coeruleus*
NA – Noradrenalina
NPY – Neuropeptídeo Y
NTS – Núcleo do trato solitário
OA – Osteoartrite
OCN – Observação comportamental nociceptiva
PAG – Substância cinzenta periaquedutal
PAR – Receptores ativados por proteases
PBN – Núcleo parabraquial
PG – Prostaglandina
PGE₂ – Prostaglandina E₂
RVM – Área rostral ventromedial da medula oblonga
SNC – Sistema nervoso central
SP – Substância P
Sp5C – Subnúcleo caudal do núcleo espinal do complexo trigeminal
Sp5I – Subnúcleo interpolar do núcleo espinal do complexo trigeminal
TGI – Trato gastrointestinal
TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa
v.o. – Via oral
5-HT – Serotonina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	ARTICULAÇÃO TEMPOROMANDIBULAR	21
1.2	FISIOANATOMIA DA ATM	22
1.2.1	Disco Articular	22
1.2.2	Membrana sinovial	23
1.2.3	Sistema muscular e Biomecânica da ATM	24
1.2.4	Inervação da ATM	25
1.3	NERVO VAGO	29
1.3.1	Nervo Vago e nocicepção	31
1.4	DESORDEM TEMPOROMANDIBULAR	33
1.5	OSTEOARTRITE	36
1.6	ABORDAGEM FARMACOLÓGICA DAS DESORDENS TEMPOROMANDIBULARES	40
1.6.1	Corticosteroides	41
1.6.2	Opioides	42
1.6.3	Anti-inflamatórios não-esteroidais	43
1.6.4	Antidepressivos	45
1.7	TRIPSINA E RECEPTORES PAR-2	46
1.7.1	Tripsina e Nervo Vago	48
1.8	IDOACETATO MONOSSÓDICO COMO MODELO EXPERIMENTAL DE OSTEOARTRITE	49
2	OBJETIVOS	53
2.1	Objetivo Geral	53
2.2	Objetivos específicos	53
2.3	Hipóteses Nulas (H_0)	53
3	MATERIAIS E MÉTODOS	55
3.1	Animais	55
3.2	Drogas	55
3.3	Injeção intra-articular de MIA	57
3.4	Protocolos experimentais	58
3.4.1	Observação Comportamental Nociceptiva	58
3.4.2	Avaliação da Ingesta Alimentar	59
3.4.3	Vagotomia Subdiafragmática	60
3.5	Cálculo de Extrapolação Alométrica	61
3.6	Desenho experimental	62
3.7	Análises estatísticas	63

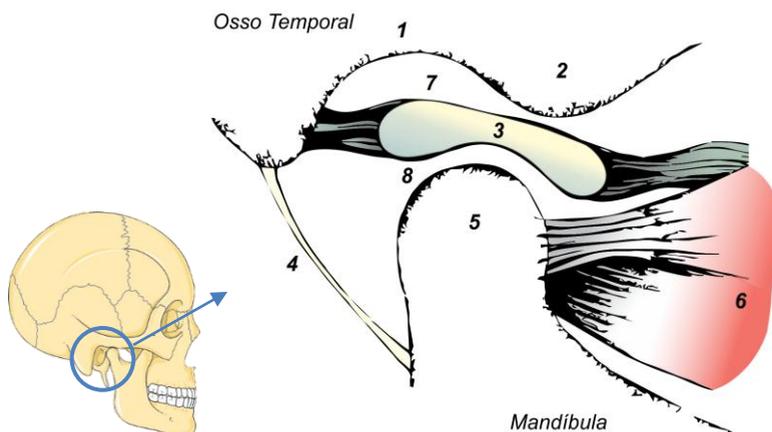
4	RESULTADOS	65
4.1	Osteoartrite induzida por MIA – Curva dose-resposta (Protocolo 1)	65
4.2	Teste de IA após os testes de OCN (Protocolo 2)	69
4.3	Curva dose-resposta dos fármacos (Protocolo 3)	73
4.3.1	DEXAMETASONA	73
4.3.2	MORFINA	75
4.3.3	PARACETAMOL	77
4.3.4	NAPROXENO	79
4.3.5	CELECOXIBE	81
4.3.6	AMITRIPTILINA	83
4.3.7	TRIPSINA	85
4.4	Efeito da Vagotomia Subdiafragmática sobre o tratamento com tripsina via oral	87
5	DISCUSSÃO	91
5.1	Osteoartrite induzida por MIA - (Protocolo 1 x Protocolo 2)	94
5.2	Testes farmacológicos – Protocolo 3: CDR-fármacos	92
5.3	Efeito da Vagotomia Subdiafragmática sobre o tratamento com tripsina via oral	109
6	CONCLUSÕES	113
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	115

1 INTRODUÇÃO

1.1 ARTICULAÇÃO TEMPOROMANDIBULAR

A articulação temporomandibular (ATM) compõe o aparelho estomatognático e representa uma articulação diartrodial bilateral formada pela cápsula articular, disco articular, eminência articular, fossa temporal e côndilo da mandíbula (EMBREE et al., 2011; MURPHY, 2011) (Fig. 1). Embora a ATM seja formada por articulações bilaterais distintas, as mesmas não realizam movimentos independentes, ou seja, participam de maneira coordenada nos movimentos mandibulares (INGAWALÉ; GOSWAMI, 2009).

Figura 1: Esquema anatômico da articulação temporomandibular.



(1) Fossa temporal; (2) Eminência articular; (3) Disco articular; (4) Cápsula articular; (5) Côndilo mandibular; (6) Músculo pterigoideo lateral; (7) Compartimento superior; (8) Compartimento inferior.
Fonte: adaptado de Servier Medical Art e Murphy, 2011.

Classificada como articulação do tipo sinovial, a ATM distingue-se das demais articulações desse grupo por apresentar as superfícies articulares revestidas por fibrocartilagem (contendo predominantemente colágeno tipo I), e não por cartilagem hialina (ou

articular) como nas demais articulações sinoviais. Tal característica permite à ATM suportar estresses mecânicos de níveis elevados, além de possibilitar uma reparação e remodelação mais efetiva das superfícies articulares (ISHIDA; YABUSHITA; ONO, 2013; RANDO; WALDRON, 2012).

As principais funções da ATM estão relacionadas com os movimentos de fala, deglutição e mastigação. Assim, esta articulação revela-se uma das mais complexas e usadas do corpo humano (INGAWALÉ; GOSWAMI, 2009). Devido sua importância funcional, o estudo das patologias que acometem tal articulação é frequente na literatura médica, a fim de melhor compreender a etiologia e estabelecer tratamentos mais eficazes para as doenças que acometem a ATM (RANDO; WALDRON, 2012).

Em estudo anatômico visual, radiográfico e com tomografia computadorizada da ATM de ratos, Orset (2013) verificou que há poucas diferenças anatômicas entre a ATM desses animais e de humanos, sendo estas somente na angulação com o plano sagital (150° contra 125° em humanos) e com o plano transversal (140° contra 180° em humanos). Além disso, observou-se a ausência de eminência articular na fossa temporal. Desta forma, o estudo da ATM e suas patologias em ratos revela-se uma alternativa viável e confiável, em termos anátomo-funcionais.

1.2 FISIOANATOMIA DA ATM

1.2.1 Disco Articular

O disco articular encontra-se no interior da cápsula articular dividindo a mesma em compartimento superior (ou supradiscal) e compartimento inferior (ou infradiscal). Estrutura fibrocartilaginosa bicôncava, o disco articular, juntamente com os ligamentos articulares, auxilia nos movimentos mandibulares, protegendo as superfícies articulares do atrito e estresse excessivos (TOMAS et al., 2006).

No sentido anteroposterior, o disco articular apresenta uma zona anterior, uma zona intermediária (mais delgada e avascular) que acompanha o côndilo mandibular durante os movimentos prevenindo danos articulares, e uma zona posterior. Juntamente com sua camada

retrodiscal superior e inferior e estruturas vasculares e nervosas da região, a zona posterior forma a zona bilaminar que apresenta importante papel na manutenção fisiológica e funcional do disco articular (FILHO; PÊGO; FERREIRA, 2010; TOMAS et al., 2006).

A região inferior do disco articular está sujeita a 3,3 vezes mais chances de alterações degenerativas quando comparada à região superior do mesmo. Dessa forma, o compartimento inferior e o côndilo mandibular estão mais propensos a episódios degenerativos quando há uma patologia desse grau instalada na ATM (SHAFFER et al., 2014).

Ainda, o desarranjo interno do disco articular, ou seja, quando o mesmo assume uma posição anormal em relação ao côndilo mandibular e a eminência articular, causando dor e limitação dos movimentos mandibulares, está entre as patologias mais comuns que afetam a ATM (FARRAR; MCCARTY, 1979; STEGENGA et al., 1993).

1.2.2 Membrana Sinovial

A membrana sinovial da ATM reveste várias estruturas intra-articulares dessa articulação, com exceção da cartilagem articular da eminência articular, fossa e côndilo mandibular e disco articular (NOBLE, 1973; PIETTE, 1993; POIGNONEC et al., 1990). Formada por duas camadas, a membrana sinovial apresenta uma camada conjuntiva superficial denominada camada íntima, que está apoiada sobre uma segunda, mais densa e vascularizada, a camada subíntima. Formada por tecido conjuntivo frouxo, a camada subíntima é densamente vascularizada e inervada. Já a camada íntima apresenta esparsas fibras colágenas envoltas por matriz extracelular, apresentando de um a quatro estratos de células com intensa atividade metabólica e capacidade regenerativa após trauma. A camada íntima pode ser diferenciada em dois tipos celulares principais: células A e células B (DIJKGRAAF et al., 1996b).

A membrana sinovial, juntamente com o líquido sinovial, exerce um papel importante de manutenção da fisiologia e função normais da ATM. Ela é responsável pela nutrição e remoção dos produtos metabólicos dos condrócitos da cartilagem articular, além de produzir os componentes do fluido sinovial. O fluido ou líquido sinovial consiste de um dialisado do plasma sanguíneo que, através de capilares

fenestrados da camada subíntima, atinge a camada íntima, onde são adicionados outros componentes ao fluido (DIJKGRAAF et al., 1996a). Ácido hialurônico, proteoglicanos, glicosaminoglicanas e glicoproteínas são alguns dos componentes adicionados. Estes são sintetizados e excretados pelas células B da camada íntima. Contudo, as células da camada A são responsáveis pela eliminação de produtos de degradação do líquido sinovial que preenche o espaço articular (DIJKGRAAF et al., 1996a; DIJKGRAAF et al., 1996b).

1.2.3 Sistema muscular e Biomecânica da ATM

Para que os movimentos mandibulares aconteçam, é necessária a participação de um conjunto de músculos localizados na cabeça, face e cervical. A biomecânica está relacionada diretamente com a interação entre músculos, estruturas articulares e elementos dentais. Dessa forma, os movimentos mandibulares e seus componentes ativos podem ser classificados em cinco eventos principais: movimento de rotação e translação (elevação e depressão da mandíbula), lateralidade, protrusão e retrusão.

- **Elevação e depressão mandibular**

O movimento de abertura (depressão da mandíbula) inicia com a rotação do côndilo (em torno do eixo da articulação) até uma abertura máxima de 20 mm. Após, o movimento de abertura da boca continua concomitante com o movimento de translação (movimento látero-lateral para anterior) até atingir a abertura máxima (em torno de 35 a 45 mm), acompanhado pelo disco articular. Os músculos participantes desse evento são os pterigoideos laterais, principalmente, com a participação dos músculos digástrico, gênio-hioideo e milo-hioideo (ALOMAR et al., 2007; MADEIRA, 2001).

Assim como o movimento de depressão, a elevação mandibular (fechamento da boca) apresenta tanto o movimento de rotação quanto de translação. Estes movimentos são acompanhados pelo disco articular em uma direção anteroposterior, tendo também participação dos músculos masseter, temporal e pterigoideo medial (KOOLSTRA, 2002; SHAFFER et al., 2014).

- **Lateralidade, protrusão e retrusão mandibular**

No movimento de lateralidade o côndilo se desloca lateralmente com o auxílio do músculo pterigoideo lateral. Na lateralidade mandibular, a guia canino é a referência para o movimento, pois se a mandíbula desloca-se para o lado direito, há contato dessa guia no referido lado, configurando o lado de trabalho. Já o lado esquerdo não apresentará (em condições normais de oclusão) contato da guia canino, configurando-se como lado de balanceio (MADEIRA, 2001).

O movimento de protrusão mandibular tem como referência a *guia incisivo*, ou seja, nesse tipo de movimento a ATM movimenta-se anteriormente até que ocorra o contato dos incisivos superiores e inferiores em condições normais de oclusão. Neste movimento há a participação ativa dos músculos pterigoideos laterais. Já no movimento de retrusão mandibular, a ATM recebe ação dos músculos digástrico e porção posterior do temporal, principalmente, para retornar à posição de repouso ou de oclusão central (MADEIRA, 2001).

1.2.4 Inervação da ATM

Em ratos, estudos têm demonstrado que a ATM desses animais possui terminações nervosas sensitivas e autonômicas inervando a membrana sinovial (cápsula articular), a porção anterior e posterior do disco articular, ligamentos articulares e periósteo do côndilo mandibular (ICHIKAWA et al., 1989; KIDO et al., 1991, 2001; UDDMAN et al., 1998).

Utilizando-se de um marcador neuronal retrógrado (TB, do inglês “True Blue”), Uddman e colaboradores (1998) mostraram que os corpos celulares das terminações nervosas da ATM de ratos são provenientes, na sua maioria, do gânglio trigeminal e gânglio cervical superior e, um número moderado desses corpos celulares localiza-se nos gânglios: ótico, nodoso, esfenopalatino, estrelado e no gânglio da raiz dorsal em nível de segunda a quinta vértebra cervical (de C2 a C5).

As terminações sensoriais são descritas, basicamente, como terminações nervosas livres compostas por fibras do tipo C (fibras amielínicas, com diâmetro menor que 1 µm) e Aδ (fibras mielínicas com

diâmetro entre 1 e 3 μm) (ICHIKAWA et al., 1990) e estão relacionadas com a mediação de sensações dolorosas e/ou proprioceptivas (ICHIKAWA et al., 1989; ICHIKAWA 1990). Estudos imuno-histoquímicos revelaram a presença de neuropeptídeos nas terminações nervosas livres - substância P (SP) e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) - tanto na ATM de humanos (ALSTERGREN et al., 1995) quanto de ratos (CARLESON et al., 1997; ICHIKAWA et al., 1990; SHINODA et al., 2003).

Além da função aferente, a inervação sensorial nociceptiva da ATM apresenta uma função eferente, a qual consiste na liberação de neuromediadores, mediadores do processo inflamatório, neuropeptídeos, aminoácidos excitatórios e fatores de crescimento nos tecidos articulares (ALSTERGREN et al., 1995; CAIRNS; SESSLE; HU, 2001). Em casos patológicos, como na artrite temporomandibular, por exemplo, essa liberação de neuropeptídeos é alterada (ALSTERGREN et al., 1995; CARLESON et al., 1997).

A ATM de ratos apresenta, ainda, inervação autonômica composta tanto por fibras simpáticas (em maior número e provenientes de corpos celulares alojados nos gânglios cervical superior e estrelado) quanto parassimpáticas (em menor contingente e provenientes do gânglio ótico e nodoso). Essas terminações autonômicas encontram-se, principalmente, circundando pequenos vasos sanguíneos e na cápsula articular e têm como principal função a regulação da vasomotricidade (vasoconstrição e vasodilatação) (ICHIKAWA et al., 1989; UDDMAN et al., 1998).

O neuropeptídeo Y (NPY) e o peptídeo intestinal vasoativo (VIP) são utilizados como marcadores para fibras simpáticas e parassimpáticas, respectivamente. Assim, estudos com estes marcadores demonstraram a presença de fibras autonômicas na ATM tanto de ratos (CARLESON et al., 1997; ERVOLINO, 2009; ICHIKAWA et al., 1989, 1990; UDDMAN et al., 1998) quanto de humanos (ALSTERGREN et al., 1995). Ainda, esses neuropeptídeos também têm sua liberação alterada em estados patológicos, participando do processo inflamatório através de sua liberação concomitante com neuropeptídeos das terminações nervosas livres. Sabe-se que o NPY tem seus níveis aumentados, concomitantemente com a SP, em doenças inflamatórias da ATM em humanos, quando comparado a

doenças degenerativas do complexo articular em questão (ALSTERGREN et al., 1995).

- **Nociceção e ATM**

As fibras do tipo C compõem no total em torno de 52,8% da inervação da ATM. Classificadas como fibras tipo C polimodais (C- POLI: 39,4%) e ainda fibras C mecanonociceptoras de alto limiar - do inglês, “high threshold mechanonociceptor (HTM)” - (C-HTM: 12,1%). Fibras polimodais apresentam maior sensibilidade às substâncias químicas ditas algógenas produzidas e liberadas durante o processo inflamatório que aumentam a excitabilidade dos nociceptores (como por exemplo a bradicinina) . As fibras A δ compõem 47,2% da inervação da articulação. Divididas entre fibras A δ polimodais (A δ -POLI: 36,4%) e/ou fibras A δ mecanonociceptoras de alto limiar (A δ -HTM: 12,1%). Dessa forma, as unidades polimodais são predominantes e representam 75,8% da inervação da ATM, o que poderia explicar porque reações inflamatórias podem evocar respostas dolorosas facilmente no complexo temporomandibular (TAKEUCHI; TODA, 2003; TAKEUCHI et al., 2004).

O nervo trigêmeo (quinto par de nervos cranianos) apresenta três ramos: oftálmico, maxilar e mandibular. Seu gânglio abriga a maior parte dos corpos celulares de neurônios nociceptivos primários que inervam a ATM (ERVOLINO, 2009; UDDMAN et al., 1998). O complexo trigeminal apresenta-se dividido em núcleos: mesencefálico (Me5), supratrigeminal (Su5), principal (Pr5), motor (Mo5) e espinal (Sp5). O Sp5 é subdividido ainda em três subnúcleos: oral (Sp5O), interpolar (Sp5I) e caudal (Sp5C) (MASCARO et al., 2008; PAXINOS, 1994). O subnúcleo espinal caudal normalmente é considerado uma extensão do corno dorsal da medula espinal e, como este, também apresenta uma divisão laminar (MASCARO et al., 2008; SESSLE, 2006).

As informações nociceptivas faciais e da ATM são transmitidas ao Sp5O e Sp5I, mas principalmente ao Sp5C, com evidências apontando para esse subnúcleo como sendo a principal estrutura responsável pelo processamento da informação nociceptiva (MASCARO et al., 2008; SESSLE, 1999; SESSLE, 2006; TSAI et al., 1999; WANG et al., 2012; YAMAZAKI et al., 2008). Neurônios desse subnúcleo expressam mais receptores associados à nociceção, tais como: neurocinina 1 (NK1), N-metil-D-aspartato (NMDA), opioides, serotoninérgicos (5-HT),

ácido gama-aminobutírico (GABA); quando comparados a neurônios das regiões mais rostrais do núcleo trigeminal espinal (CAIRNS, 2010).

Os neurônios do Sp5C podem ser classificados como de ampla faixa dinâmica (do inglês “wide dynamic range” – WDR), podendo receber impulsos não só de fibras C e A δ de pequeno diâmetro (respondendo a estímulos nocivos), mas também de fibras de maior diâmetro não relacionadas com estímulos nociceptivos. Ou ainda como neurônios nociceptivos específicos (do inglês, “nociceptive-specific (NS) neurones”), os quais recebem impulsos de fibras A δ ou C de pequeno diâmetro que respondem somente a estímulos nocivos (SESSLE, 2000, 2006; YAMAZAKI et al., 2008).

As informações nociceptivas faciais e da ATM são transmitidas ao Sp5I, mas principalmente ao Sp5C, com evidências apontando para esse subnúcleo como sendo a principal estrutura responsável pelo processamento da informação nociceptiva (MASCARO et al., 2008; SESSLE, 1999; SESSLE, 2006; WANG et al., 2012; YAMAZAKI et al., 2008). Neurônios desse subnúcleo expressam mais receptores associados à nocicepção, tais como: neurocinina 1 (NK1), N-metil-D-aspartato (NMDA), opioides, serotoninérgicos (5-HT), ácido gama-aminobutírico (GABA); quando comparados a neurônios das regiões mais rostrais do núcleo trigeminal espinal (CAIRNS, 2010). Os neurônios do Sp5C podem ser classificados como de ampla faixa dinâmica (do inglês “wide dynamic range” – WDR), podendo receber impulsos não só de fibras C e A δ , mas também de fibras de maior diâmetro não relacionadas com estímulos nociceptivos (SESSLE, 2000; YAMAZAKI et al., 2008).

Estudos demonstram, ainda, que o Sp5C possui projeções nervosas de segunda ordem para outras estruturas, como tálamo e córtex cerebral. Além disso, a informação nociceptiva que atinge o Sp5C está sujeita a modulações por projeções de outros núcleos que constituem o sistema endógeno de modulação da dor (SESSLE, 1999; SESSLE 2006). Sabe-se que a substância cinzenta periaquedutal (PAG) age de maneira inibitória sobre o Sp5C, diretamente ou através da área rostral ventromedial do bulbo (RVM). O RVM também pode agir diretamente sobre o Sp5C ou, ainda, através de projeções localizadas no *locus coeruleus* (LC) (MORGAN; GEBHART, 2008). Estudos ainda relatam conexões com outros núcleos da via descendente inibitória, como: o núcleo do trato solitário (NTS), a área caudal ventrolateral do

bulbo (CLVM), núcleo reticular ventral (NRV) e núcleo parabraquial (PBN) (TAVARES et al., 1996; TAVARES; LIMA, 1994; TAVARES; LIMA, 2002; YAMAZAKI et al., 2008; ERVOLINO, 2009).

Alguns eventos podem sensibilizar as terminações nervosas livres da ATM e acionar mecanismos periféricos e, conseqüentemente, sensibilizar neurônios do Sistema Nervoso Central (SNC) pertencentes às vias ascendentes de dor. Uma sobrecarga excessiva das estruturas articulares pode desencadear dor por estimulação de fibras mecanonociceptoras, bem como aumentar a liberação de mediadores inflamatórios (fator de necrose tumoral alfa [TNF- α] e interleucinas, em particular) e neuropeptídeos (como CGRP e SP), ou ainda, levar a episódios de hipóxia (CAIRNS, 2010; KANEYAMA et al., 2005a).

A inflamação aumenta a pressão intra-articular e, quando esta excede a pressão de perfusão capilar, induz à hipóxia localizada. A mitigação desse evento leva à produção de radicais livres de oxigênio que promovem a degradação do ácido hialurônico, prejudicando a viscosidade do fluido sinovial e aumentando, assim, o estresse mecânico da articulação, extrapolando a capacidade de remodelação adaptativa da mesma e, dessa forma, agravando o quadro degenerativo (MILAM, 1998; TANAKA et al., 2008).

O quadro inflamatório promove a liberação de citocinas pró-inflamatórias que contribuem na degeneração da cartilagem. Estas por sua vez, auxiliam na liberação de vários outros compostos pró-nociceptivos, como: serotonina, leucotrienos B₄, prostaglandina E₂ (PGE₂), bradicinina, histamina, glutamato e trifosfato de adenosina (ATP) (CAIRNS, 2010). Estes componentes mostraram-se excitadores de nociceptores da ATM e do Sp5, além de desencadarem dor em modelos animais (CAIRNS et al., 2001; FLAKE; GOLD, 2005; OLIVEIRA et al., 2005; TAKEUCHI et al., 2001; TAKEUCHI et al., 2004).

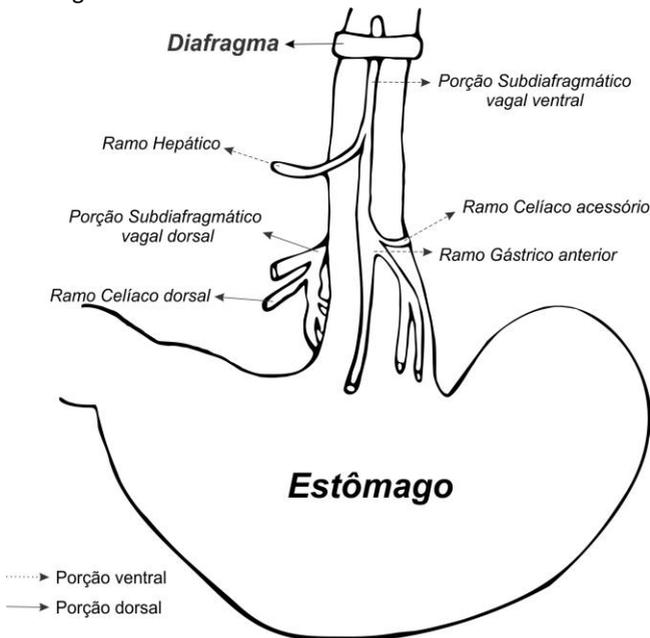
1.3 NERVO VAGO

Décimo par dos nervos cranianos, o nervo vago emerge do sulco lateral posterior do bulbo (de onde se originam as fibras eferentes do nervo) e, através do forame jugular, inerva autonomicamente (como elemento do Sistema Nervoso Parassimpático) a região torácica e abdominal. Possui dois gânglios de onde se originam as fibras

sensitivas, o gânglio superior (ou jugular) e o gânglio inferior (ou nodoso) (MACHADO, 2000).

A descrição anatômica vagal tem sido feita em diversas espécies, principalmente em ratos, e se assemelha à anatomia humano do nervo. Dessa maneira, o nervo vago apresenta dois ramos, o ramo cervical e torácico e o ramo abdominal. Deste último, a porção subdiafragmática é dividida em ramo subdiafragmático ventral e dorsal. A porção subdiafragmática ventral acompanha longitudinalmente a superfície ventral do esôfago e dá origem aos ramos hepático, celíaco acessório e gástrico anterior. Todavia, a porção subdiafragmática dorsal separa-se em ramo celíaco e ramo gástrico posterior (BERTHOUD; NEUHUBER, 2000; PRECHTL; POWLEY, 1985; PRECHTL; POWLEY, 1990) (Fig. 2).

Figura 2: Esquema anatômico da porção subdiafragmática do nervo vago e seus ramos no rato.



Fonte: adaptado de Prechtl, 1990.

As aferências vagais que inervam o trato gastrointestinal (TGI), envolvidas no controle de secreção, motilidade e sensibilização imune

do mesmo, podem ser ativadas de três maneiras: 1) diretamente pela abertura de canais iônicos nos terminais nervosos; 2) por sensibilização, que normalmente envolve um episódio de hiperexcitabilidade aferente, seja por estímulos químicos ou mecânicos; 3) e pela alteração do ambiente ou fenótipo das fibras aferentes, através da manipulação da expressão de canais, mediadores e receptores ou de seus ligantes e sítios de ligação (KIRKUP et al., 2001).

Os aferentes vagais possuem uma ligação estreita com o sistema imune. Respostas a enfermidades (incluindo hiperalgesia e dor) são provocadas por estímulos patogênicos nas vísceras. Produtos de patógenos, como o lipolissacarídeo (LPS), ativam células imunes e estas secretam mediadores (citocinas pró-inflamatórias). Esses mediadores ativam os aferentes vagais do ramo hepático da porção subdiafragmática do nervo vago, de maneira direta ou de maneira indireta através de paragânglios vagais. Uma vez sensibilizado, o núcleo do complexo vagal dorsal ativa neurônios de segunda ordem no NTS, responsável pela ativação de vias de respostas imunes a infecções (ativação do eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal) (GOEHLER et al., 2000; VAN DER ZANDEN et al., 2009).

Ainda, na revisão de van der Zanden (2009) relata-se outra possível forma de participação do nervo vago no controle da inflamação através da ativação de receptores nicotínicos em macrófagos. O estímulo do nervo vago (componente do sistema parassimpático e conseqüentemente classificado como parte do sistema colinérgico) proporciona um reflexo anti-inflamatório colinérgico durante episódios inflamatórios. A liberação de acetilcolina inibe a liberação de citocinas por macrófagos de maneira direta, através da ativação do receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 7$ expresso na superfície dessas células.

1.3.1 Nervo Vago e nocicepção

Os mecanismos pelos quais a estimulação do nervo vago modula a nocicepção ainda não são claros. No entanto, estudos vêm demonstrando as vias pelas quais esse nervo desempenha função facilitatória ou inibitória da dor (BOHOTIN et al., 2003; RANDICH;

GEBHART, 1992). Exemplo do exposto são estudos em ratos demonstrando que o efeito analgésico decorrente da ativação do nervo vago parece depender da intensidade de estimulação de fibras C. Ou seja, estimulação de baixa intensidade de aferentes vagais cervicais facilita o reflexo nociceptivo, como em movimentos de abertura bucal e no teste de retirada de cauda (do inglês, "tail flick"). Contudo, estimulação de alta intensidade promove a inibição do reflexo nociceptivo nessas duas situações citadas (REN et al., 1988).

A transmissão sensorial dos aferentes viscerais vagais até centros superiores do SNC é sustentada pelo NTS, uma vez que este se revela como uma ponte entre o sistema autonômico e o sistema sensorial. O estímulo deste núcleo pode produzir antinocicepção. Desta forma, suas projeções neurais de segunda ordem para outros núcleos do SNC participam de uma rede efetiva no controle da dor, a via descendente inibitória (para revisão, ler Millan, 2002). Dentre as conexões realizadas pelo NTS estão o hipotálamo, PBN, PAG e núcleos monoaminérgicos do tronco cerebral: o LC (origem de neurônios noradrenérgicos) e núcleo da rafe (cujos neurônios são em sua maioria serotoninérgicos) (BERTHOUD; NEUHUBER, 2000; CLAVIER, 1979; DUBNER; REN, 2004; JÄNIG et al., 2000; MILLAN, 2002).

A estimulação vagal em modelos animais corrobora o papel do nervo vago em eventos nociceptivos. Por exemplo, a estimulação cardiopulmonar de aferentes vagais é capaz de modular a resposta neuronal a estímulos nocivos de calor e elétricos na polpa dental (BOSSUT; MAIXNER, 1996). Ainda, a estimulação fisiológica de aferentes vagais pela expansão de volume vascular inibiu a transmissão nociceptiva pulpar (TAKEDA et al., 2002). Verificou-se que a estimulação do nervo vago foi capaz de modular a atividade de neurônios do Sp50 e ativar vias noradrenérgicas e serotoninérgicas e, dessa maneira, inibir a transmissão nociceptiva pulpar (TANIMOTO et al., 2002). Ainda, a estimulação vagal reduziu comportamentos nociceptivos em modelos de nocicepção orofacial induzida por formalina (BOHOTIN et al., 2003).

Estudos com vagotomia (secção do nervo vago), principalmente com a porção subdiafragmática do mesmo em ratos, têm demonstrado a relação entre aferência vagal e nocicepção. A vagotomia subdiafragmática foi capaz de reduzir o limiar mecânico de retirada de

pata em ratos (KHASAR et al., 1998a), bem como aumentar a hiperalgesia desencadeada pela bradicinina (KHASAR et al., 1998b).

Em modelos inflamatórios da ATM induzidos por óleo de mostarda, a vagotomia cervical foi capaz de impedir a redução de Fos-LI induzida por morfina no Sp5 de ratos (BEREITER et al., 2002). Em modelo de inflamação da ATM induzida por adjuvante completo de Freund (CFA), o procedimento de transecção do ramo vagal cervical foi capaz de reduzir limiares de resposta frente ao estímulo térmico de frio e mecânicos, e a estimulação elétrica do mesmo foi capaz de inibir a resposta nociceptiva de neurônios do subnúcleo caudal do trigêmeo (YAMAZAKI et al., 2008).

Com as evidências citadas acima, a manipulação vagal revela-se um alvo consistente no estudo da dor e de novas formas de analgesia. Corroborando sua relação com a ATM e centros da via descendente inibitória da dor, novas formas de modulação do nervo vago podem constituir ferramenta farmacológica de promissor uso clínico.

1.4 DESORDEM TEMPOROMANDIBULAR

Em 1996, a Associação Americana de Pesquisa Odontológica (AADR – do inglês, “American Association of Dental Research”) reconheceu que toda condição que desencadeia desarranjo da função fisiológica normal da ATM, músculos mastigatórios e estruturas musculoesqueléticas associadas, pode ser classificada como um subgrupo de dores craniofaciais, sendo denominada de Desordem Temporomandibular (DTM) (SCRIVANI; KEITH; KABAN, 2008; SHAEFER et al., 2013). Estas desordens temporomandibulares podem levar a danos na mastigação e/ou outra função oral, dor aguda ou crônica, prejuízo à interação social ou capacidade de trabalho, ou seja, detrimento da qualidade de vida do paciente (AADR REPORTS, 1996; GREENE, 2010).

Estima-se que no mínimo 10% da população adulta e 50% da população idosa é afetada por algum tipo de dor orofacial (MADLAND; NEWTON-JOHN; FEINMANN, 2001). Ainda, estudos epidemiológicos sugerem que 25% da população pode apresentar algum sintoma de DTM (DE KANTER et al., 1993) e que 10% dela (com idade acima de 18 anos) convive com episódios de dor na região temporomandibular

(EGERMARK; CARLSSON; MAGNUSSON, 2001; LERESCHE, 1997). No entanto, deste percentual, apenas uma pequena parcela de indivíduos procura tratamento (MURPHY, 2011), e destes pacientes com quadros de dor temporomandibular que buscam tratamento, 80 a 90% são mulheres (CAIRNS, 2010; SCRIVANI; KEITH; KABAN, 2008). Embora haja várias razões para as diferenças relacionadas ao sexo, a mais sustentada é a participação de hormônios sexuais femininos na dor músculo-articular facial. A flutuação dos níveis hormonais antes e durante do ciclo menstrual influencia na percepção dolorosa de mulheres (ABUBAKER; HEBDA; GUNSOLLEY, 1996; LANDI et al., 2005; LERESCHE et al., 2003), bem como os níveis de estradiol e progesterona durante o ciclo estral em ratas (FISCHER et al., 2008; TORRES-CHÁVEZ et al., 2012).

Com o avanço nas pesquisas envolvendo as DTMs, uma melhor compreensão da etiologia dessa condição foi possível. As causas da DTM podem ser consideradas multifatoriais, incluindo fatores biológicos, sociais, emocionais, ambientais e cognitivos que, em conjunto, contribuem para o aparecimento dos sinais e sintomas das DTMs (DE LEEUW, 2008; SCRIVANI; KEITH; KABAN, 2008). A Tabela 1 traz a classificação das DTMs.

Tabela 1: Classificação das DTMs.

<p>Desordens Articulares</p> <p>Congênitas ou de desenvolvimento</p> <p>Desordens de desarranjo interno de disco</p> <ul style="list-style-type: none"> Desarranjo com redução Desarranjo sem redução Perfuração <p>Desordens articulares degenerativas</p> <ul style="list-style-type: none"> Inflamatórias: capsulite, sinovite, poliartrites (artrite reumatoide, artrite psoriática, espondilite anquilosante, síndrome de Reiter, gota). Não-inflamatórias: osteoartrite <p>Trauma</p> <ul style="list-style-type: none"> Contusão Hemorragia intracapsular Fratura <p>Hipermobilidade temporomandibular</p> <ul style="list-style-type: none"> Luxação articular Subluxação Deslocamento <p>Hipomobilidade temporomandibular</p> <ul style="list-style-type: none"> Trismo Fibrose pós-tratamento de radiação Anquilose <p>Infecções</p> <p>Neoplasias</p> <p>Desordens dos músculos mastigatórios</p> <p>Dor miofacial</p> <p>Mialgia local</p> <p>Miosite</p> <p>Mioespamos</p> <p>Contratura miofibrótica</p> <p>Neoplasia</p>

Fonte: adaptado de Scrivani, 2008.

Uma abordagem multifatorial e individual revela-se imperativa para um correto diagnóstico da DTM. O diagnóstico diferencial deveria incluir desde exames para causas de dor facial de princípios odontogênicos (cárie, doença periodontal ou endodôntica, maloclusão) e/ou não-odontogênicos (tumores, neuralgia do trigêmeo, síndromes de dores de cabeça, doenças sistêmicas e/ou autoimunes, diabetes) para se excluir quaisquer desordens com origens diferentes das DTMs e que acometem o aparelho estomatognático (SCRIVANI; KEITH; KABAN, 2008).

Os sinais e sintomas de DTMs, apesar de apresentarem grande variabilidade, diferem de acordo com manifestações aguda e/ou crônicas. Nas DTMs ditas agudas, os principais sinais e sintomas observados são: sons articulares (estalidos, crepitação); alteração e limitação de movimentos mandibulares; dor, rigidez e perda de força muscular na ATM e estruturas adjacentes (incluindo cabeça, pescoço e ombros); e zumbidos e otalgia (DE BONT; DIJKGRAAF; STEGENGA, 1997; DURHAM, 2008). Em DTMs ditas crônicas, os sintomas apresentam, ainda, alterações mais pontuais do SNC, adicionando ao quadro doloroso que se torna mais amplo e persistente: distúrbios do sono, depressão, fadiga crônica, decréscimo de produtividade e prejuízos psicossociais (AUVENSHINE, 2000).

Ainda, indivíduos com DTM exibem sintomas de hiperexcitabilidade do SNC. Dessa forma, uma grande porcentagem dos pacientes apresenta alguma comorbidade condizente com essa abrangente sensibilização central, sendo associada à DTM (CAIRNS, 2010; SHAEFER et al., 2013; YOUNGER et al., 2010). Estudos têm demonstrado a relação e prevalência de várias comorbidades coexistentes com DTM em humanos, onde o desenvolvimento destas comorbidades revela-se mais comum após a instalação de alguma DTM (HOFFMANN et al., 2011; KORSZUN et al., 1998; SHAEFER et al., 2013).

1.5 OSTEOARTRITE

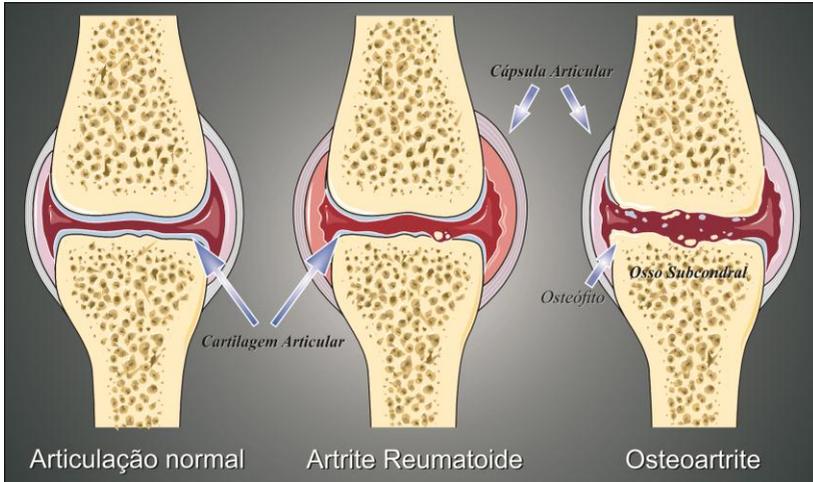
Entre as patologias que acometem a ATM, a doença articular degenerativa ou osteoartrite constitui-se a mais comum (TANAKA et al., 2008). Segundo a Organização Mundial de Saúde, 10% da população mundial acima de 60 anos sofre de algum tipo de dor

associada à OA, sendo, por esta razão, considerada uma doença relacionada à idade (NELSON et al., 2014; SANO et al., 2007; WHO, 2003). Ainda, entre gêneros, sua prevalência após os 65 anos revela-se de 60% em homens e 70% em mulheres (SARZI-PUTTINI et al., 2005), sendo considerada uma das principais doenças articulares que leva à instalação de dor crônica e prejuízo da função articular (BEYREUTHER; CALLIZOT; STÖHR, 2007).

Não há consenso sobre o fator predisponente primário da OA na ATM (MOHAN et al., 2011), apresentando origem idiopática na maioria dos casos (DE BONT; DIJKGRAAF; STEGENGA, 1997; SARZI-PUTTINI et al., 2005). Contudo, devido a sua etiologia multifatorial, pode resultar e ter sua progressão acelerada por traumas, infecções, distúrbios metabólicos, estresse mecânico e cirurgias articulares prévias (DE LEEUW, 2008; MOHAN et al., 2013; STRASSLE et al., 2010). Os pacientes normalmente relatam dor e limitação nos movimentos mandibulares e desvio da mandíbula para o lado afetado. Além disso, também há presença de ruídos articulares (crepitação) e sensibilidade aguda à palpação (DIJKGRAAF et al., 1996b; MACHON et al., 2011; SCRIVANI et al., 2008). Dessa forma, o tratamento da OA normalmente tem por finalidade aliviar os sintomas de dor e/ou melhorar a função articular (BEYREUTHER et al., 2007).

Ao contrário da artrite reumatoide, a OA caracteriza-se por possuir origem não-inflamatória. Ainda, as alterações morfológicas acometem, também, o osso subcondral e não somente a cartilagem articular. Esta sofre abrasão e erosão, enquanto aquele apresenta remodelação e esclerose óssea (com formação de osteófitos) (GUINGAMP et al., 1997; TANAKA; DETAMORE; MERCURI, 2008) (Fig. 3). A área atingida pela osteoartrite apresenta, também, fibrilação da superfície cartilaginosa, perda de volume e proliferação de condrócitos (incapazes de sintetizar matriz de qualidade) (CEVIDANES et al., 2010; HASHIMOTO et al., 2008). As alterações ósseas ocorrem precocemente e perduram até os estágios mais tardios da OA (BOYD et al., 2005).

Figura 3: Representação esquemática das alterações morfológicas provocadas por doença inflamatória e degenerativa em complexos articulares.



O envolvimento do osso subcondral, com formação de osteófitos e consequente remodelação óssea são características da osteoartrite. Fonte: adaptado de Servier Medical Art.

Quando o equilíbrio homeostático de condrócitos da cartilagem articular é rompido, ou seja, quando os eventos de catabolismo e anabolismo são alterados, há instalação de desordem do tipo osteoartítica na articulação (HASHIMOTO et al., 2008). Normalmente esse processo é acompanhado pela instalação de alterações inflamatórias secundárias no líquido sinovial e detrimento da biomecânica articular e do disco articular (DE BONT; DIJKGRAAF; STEGENGA, 1997).

Estudos têm demonstrado diferenças morfológicas associadas com severidade e duração da dor em pacientes com OA em comparação com pacientes assintomáticos (CEVIDANES et al., 2010; KIM et al., 2012). Além disso, a avaliação da ATM de pacientes com OA revelou a expressão de citocinas pró-inflamatórias (interleucina -1, -2, -12p35, -12p40, -17; fator de necrose tumoral α e β ; e interferon gama [IFN γ]) e sua relação com a patogenia (HONDA, 2011; VERNAL et al., 2008), e o mesmo foi mensurado em camundongos (NEDAJ et al., 2011) e em ratos (LAI et al., 2006), demonstrando semelhança na

expressão de tais citocinas. Ainda, vários mediadores inflamatórios e metaloproteinases têm sido relacionados como possíveis marcadores da OA temporomandibular (PGE₂; óxido nítrico sintase induzida [iNOS]; ligante ativador do receptor para fator nuclear kappa B [NF-κB] [RANKL]; osteoprotegerina; metaloproteinase-2 e -9; e agreganase-1 e -2) (HASHIMOTO et al., 2008; KANEYAMA et al., 2005b; KUBOTA et al., 1998; TANAKA et al., 2001; YOSHIDA et al., 2005).

Sugere-se que a OA temporomandibular apresenta quatro estágios. A fase inicial ou estágio de reparação é caracterizado pela proliferação de condrócitos, aumento na síntese de componentes da matriz extracelular (CME) e da síntese de DNA. Os eventos dessa fase são mediados, principalmente, por fatores de crescimento e conseguem compensar a degradação da cartilagem. Esta fase pode manter-se assintomática durante anos (DIJKGRAAF et al., 1995; HAWKER et al., 2008).

A segunda fase ou estágio precoce apresenta a síntese de CME excedida pela síntese e atividade de proteases (responsáveis por sua degradação), dando início à cascata de degeneração e perda da cartilagem. Nesse estágio observa-se início de irregularidades na superfície da cartilagem com a trama de colágeno mostrando sinais de desorganização (DIJKGRAAF et al., 1995). Nessa fase a dor é previsível, normalmente desencadeada por algum episódio específico, como uso da articulação (HAWKER et al., 2008).

A terceira fase ou estágio intermediário caracteriza-se pela falha na síntese dos CME e manutenção do aumento da atividade e síntese de proteases, com progressão da degradação cartilaginosa. A fibrilação (com intensa desorganização das fibras colágenas), degeneração e necrose de condrócitos e aumento de fibras elásticas estão presentes nesse estágio. Ainda, desarranjo interno do disco articular pode acontecer devido à presença de uma superfície articular irregular e não mais lisa. Além disso, a membrana sinovial pode apresentar-se hipervascularizada e hipertrófica ou fibrótica. Clinicamente pode haver manifestação de sintomas dolorosos mais constantes e limitação de movimentos mandibulares; as atividades diárias começam a ser afetadas (DIJKGRAAF et al., 1995; HAWKER et al., 2008).

Já a quarta fase ou estágio tardio da OA mostra-se com progressiva degradação dos CME e atividade de proteases, necrose de condrócitos mais pronunciada e completa desorganização e

desintegração da rede de colágeno. Contudo, a síntese de proteases pode ser reduzida se a cartilagem articular apresentar-se extremamente fina e/ou quase destruída por completo (resultando na chamada OA residual). Clinicamente, verifica-se dor maçante constante caracterizada por imprevisíveis episódios curtos de dor intensa, que levam o paciente à exaustão; e detrimento dos movimentos mandibulares como principais sintomas, podendo, ainda, ocorrer desarranjo do disco articular e perfuração do mesmo, levando a ruídos articulares. No caso de OA residual da fibrocartilagem articular, os sinais e sintomas podem cessar nessa fase (DIJKGRAAF et al., 1995; HAWKER et al., 2008).

1.6 ABORDAGEM FARMACOLÓGICA DAS DESORDENS TEMPOROMANDIBULARES

As DTMs podem apresentar estágios agudos e crônicos. Assim, a terapia farmacológica revela-se como coadjuvante no tratamento dessas disfunções, tendo como principal objetivo o alívio da dor, o conforto e a reabilitação do paciente, desde que componha um programa mais amplo de tratamento (como acompanhamento fisioterápico, cirúrgico e manutenção odontológica) (DIONNE, 1997; HERSH et al, 2008). Como as DTMs apresentam caráter de sensibilização central além de eventos periféricos, a abordagem farmacológica pode envolver desde analgésicos e anti-inflamatórios não-esteroidais (AINES) (fármacos de primeira escolha), até fármacos com ação no SNC. Sendo assim, continua-se dependendo de um diagnóstico diferencial no que tange as DTMs e uma avaliação individualizada do paciente para indicação da melhor terapia, levando-se em consideração os possíveis efeitos adversos, tóxicos, possível dependência e desfecho desejado (LIST et al., 2003).

No tratamento da OA a terapia farmacológica apresenta um papel paliativo devido à natureza crônica dessa patologia. O objetivo é a redução da dor, a manutenção ou melhora da mobilidade articular e redução do prejuízo funcional, mas não a promoção da remissão ou paralização da doença (BOBACZ, 2013; HERSH et al., 2008; MACHON et al., 2011; COMBE et al, 2004). Não há um “padrão ouro” em relação ao tratamento farmacológico da osteoartrite.

Dessa forma, segundo a Sociedade Internacional de Pesquisa da Osteoartrite (do inglês, “Osteoarthritis Research Society International – OARSI”), a abordagem farmacológica da OA, assim como em DTMs crônicas, inicia com analgésicos como paracetamol nos estágios iniciais da doença, seguido de AINES seletivos ou não-seletivos via oral ou tópicos (úteis para pacientes com problemas gastrointestinais), podendo abranger o uso de capsaicina tópica e injeção intra-articular de corticosteroides (BLOCK, 2014; MCALINDON et al., 2014). Estas abordagens citadas são considerados agentes de “ação rápida” no controle da dor da OA (BOBACZ, 2013).

Ainda, tratamento envolvendo o uso oral de diacereína, sulfato de condroitina e glicosamina, bem como injeção intra-articular de ácido hialurônico são utilizados como agentes de “ação lenta” (BOBACZ, 2013). Contudo, o sulfato de condroitina e glicosamina não apresentam resultados satisfatórios em relação a efeito analgésico e condroprotetor, principalmente em pacientes com OA de joelho e quadril (WANDEL et al., 2010).

Segundo a OARSI, o uso de opioides e antidepressivos pode compor o quadro de fármacos para tratamento da dor na OA. Indicados nos casos de OA com ou sem comorbidades associadas e como opção de tratamento caso as abordagens iniciais não tenham resposta. O antidepressivo dual duloxetine é o mais citado para terapia, bem como opioides ditos fracos, como tramadol e codeína, que normalmente são associados a algum AINE ou analgésico, como paracetamol (BLOCK, 2014; MCALINDON et al., 2014; MCCARBERG et al., 2013).

1.6.1 Corticosteroides

Corticosteroides são fármacos de poderosa ação anti-inflamatória que podem ser administrados tanto oralmente, em injeções intra-articulares ou topicamente no tratamento de DTMs (ALSTERGREN et al., 1996; KOPP et al., 1991; WENNEBERG et al., 1991). Apresentam eficácia no controle da dor da OA em humanos, por meio de aplicação intra-articular (BJØRNLAND et al., 2007) ou administração via oral de baixas doses de corticoides (ABOU-RAYA et al., 2014). Em ratos os corticoides também têm demonstrado eficácia no controle da dor em modelos de ATM (KERINS et al., 2005) e em modelos

ortodônticos (HAN et al., 2010). Ainda, observou-se controle na liberação e produção de mediadores inflamatórios em modelo de inflamação na ATM de coelhos (SWIFT et al., 1998a).

Sua eficácia deve-se à múltipla ação dessa classe de fármacos, pois modulam, por meio da síntese de proteínas que promovem a inibição da enzima fosfolipase A₂, a produção de PGs e leucotrienos e, ainda, modulam a atividade e número de células pró-inflamatórias (como eosinófilos, linfócitos, basófilos e macrófagos) e citocinas (interleucinas, TNF- α , fatores de adesão celular), além de aumentar a síntese de fatores anti-inflamatórios como IL-10 e anexina-1 (HERSH et al., 2008; RANG et al., 2011).

A limitação para o uso de corticosteroides como terapia de DTM e OA é o uso crônico e seus efeitos adversos. A injeção intra-articular frequente pode desencadear destruição da cartilagem, infecções e progressão da doença, devendo ser indicada para casos mais severos. A terapia oral também apresenta limitações, uma vez que o uso contínuo por mais de duas semanas pode levar à elevação dos níveis de glicose sanguínea, osteoporose (pela diminuição da atividade de osteoblastos e aumento da ativação de osteoclastos), aumento dos riscos a infecções (redução da atividade de resposta imunológica inata e adquirida) e supressão do eixo hipotalâmico-pituitária-adrenal (efeito de retroalimentação negativa, resultando em liberação reduzida de glicocorticoides endógenos) (DIONNE, 1997; HERSH et al., 2008; RANG et al., 2011).

1.6.2 Opioides

Opioides são considerados fármacos mais poderosos no controle da dor. Ativam receptores opioides acoplados à proteína G principalmente por meio de proteínas Gi/Go, promovendo redução da liberação de neurotransmissores e da atividade sináptica (RACHINGER-ADAM et al., 2011). Os receptores opioides, na sua maioria, distribuem-se pelo SNC e apresentam eficácia analgésica comprovada em patologias que envolvem a ATM, como na OA tanto em humanos (BELTRÁN et al., 1998; LIST et al., 2001; THORNE et al., 2008) quanto em ratos (ALVAREZ et al., 2003; BEREITER et al., 2000; BONJARDIM et

al., 2009; CHANDRAN et al., 2009; COMBE et al., 2004; HARTWIG et al., 2003; NAGASE et al., 2012; VONSY et al., 2009).

Na tentativa de minimizar os efeitos colaterais dos opioides, tem-se investigado o papel de seus receptores periféricos amplamente expressos por neurônios sensoriais primários. O receptor kappa foi encontrado na ATM de ratos e sua ativação mostrou-se efetiva no controle da dor e do processo inflamatório nesta articulação, promovendo controle do extravasamento plasmático e migração neutrofílica (ARTHURI et al., 2005; CHICRE-ALCÂNTARA et al., 2012). Contudo, em estudo da OA temporomandibular em humanos, a injeção intra-articular de morfina não demonstrou relevância clínica no controle da dor segundo os pesquisadores (LIST et al., 2001).

O uso de opioides para dores crônicas não-cancerosas divide opiniões. O uso cauteloso para este fim atribui-se aos efeitos adversos de dependência e tolerância desses fármacos, principalmente (DIONNE, 2001). Desse modo, a maioria dos tratamentos faz uso de opioides fracos com associação a algum analgésico ou AINE, como é o caso da codeína e do tramadol (THORNE et al., 2008), conhecidos pela eficácia analgésica e efeitos colaterais diminuídos (entre eles dependência e constipação), sendo a primeira escolha, dentro dessa classe de fármacos, na terapia das DTMs.

1.6.3 Anti-inflamatórios não-esteroidais

AINES são fármacos de primeira escolha no tratamento de DTMs. Devido sua ação inibidora sobre enzimas cicloxigenases (COX), principalmente em nível periférico, têm sua ação analgésica e anti-inflamatória no bloqueio da cascata de ácido araquidônico (AA) e, conseqüentemente, da produção de prostanoídes e leucotrienos (ambos com ação pró-inflamatória). Dessa forma, tanto AINES não-seletivos (inibem as duas isoformas da COX: a cicloxigenase-1 [COX-1] e cicloxigenase-2 [COX-2]), quanto AINES seletivos para COX-2 (os coxibes) (HERSH et al., 2008; TA; DIONNE, 2004) são utilizados na terapia farmacológica das DTMs, incluindo OA. Estudos têm demonstrado a presença de PGE₂ no líquido sinovial de pacientes com DTM e OA (ALSTERGREN; KOPP, 2000; AMIN et al., 1997; VOS et al., 2013, 2014), assim, o uso de AINES no controle da produção de

prostaglandinas (PGs), para modular a dor e inflamação, revela-se medida farmacológica útil.

A COX-1 é dita constitutiva e participa da proteção da mucosa gástrica, função renal e função plaquetária. Já a COX-2 é expressa constitutivamente em muitos tecidos, incluindo o SNC, rins e ossos (VANEGAS; SCHAIBLE, 2001). Contudo, também se faz presente de forma indutiva após injúrias teciduais, contribuindo para o processo inflamatório e hiperalgesia (SAXENA; RAMACHANDRAN, 2005). Dessa maneira, os AINES não-seletivos têm seu uso crônico limitado no tratamento das DTMs devido, principalmente, à formação de lesões gastrointestinais (DIONNE, 1997). Além disso, o uso contínuo de coxibes tem sido relacionado com aumento nos riscos de acidentes cardiovasculares (SOLOMON et al., 2005).

Estudos comparando ação analgésica do naproxeno e celecoxibe (AINE não-seletivo e seletivo para COX-2, respectivamente) mostraram eficácia no controle da dor comparados com placebo em pacientes com DTM, no entanto, não houve diferença entre eles (DEEKS et al., 2002; TA; DIONNE, 2004). Ambos o AINES, celecoxibe e naproxeno, também foram eficazes em reduzir episódios dolorosos em pacientes com OA de joelho em análise durante seis meses, contudo os fármacos não apresentaram diferença entre eles (ESSEX et al., 2012). Estes compostos mostraram resultados positivos, também, em modelos de OA em joelho (NAGASE et al., 2012), reduzindo comportamentos nociceptivos em ratos. Contudo, os estudos com coxibes apontam para uma “fraca eficácia” em relação ao controle da dor em comparação com placebos, sendo que os resultados seriam sensíveis, na verdade, aos delineamentos dos estudos (BJORDAL et al., 2004).

O acetaminofeno (denominação americana) ou paracetamol (denominação europeia) foi introduzido no mercado há várias décadas, mas até hoje seu mecanismo de ação permanece incerto. Fármaco com ação antipirética e analgésica de eficácia comprovada revela fraca ação anti-inflamatória, contudo, entre os AINES, apresenta a menor incidência de efeitos colaterais (HÖGESTÄTT et al., 2005) e é um dos fármacos de primeira escolha do tratamento da dor da OA (MCALINDON et al., 2014). Seu uso pode ser isolado ou em combinação com AINES e opioides, apresentando resultados no tratamento de dores leves a severas (JOZWIAK-BEBENISTA; NOWAK, 2014).

O paracetamol mostrou-se eficaz no controle da dor em pacientes com OA de joelho e quadril (STAM et al., 2012; TOWHEED et al., 2006; ZHANG et al., 2004) e também na melhora da função articular (SHEN et al., 2006). Em estudo comparando a eficácia do paracetamol com o naproxeno durante seis ou doze meses, ambos os fármacos foram capazes de reduzir a dor, mas sem apresentar diferença quanto a eficácia entre os grupos, em pacientes com OA de joelho e/ou quadril (TEMPLE et al., 2006). Em ratos, o fármaco foi capaz de reduzir o diâmetro do joelho e aumentar a mobilidade dos animais, além de diminuir a expressão de c-Fos em nível espinal em modelo de artrite induzida por carragenina (ARUN et al., 2013).

1.6.4 Antidepressivos

Antidepressivos têm sido usados para controle da dor nos últimos trinta anos. Seus efeitos analgésicos independem do seu efeito antidepressivo devido às baixas doses necessárias para se obter o desfecho analgésico (DIONNE, 1997). Antidepressivos inibem a recaptação de noradrenalina (NA) e/ou serotonina ou a ação da enzima monoaminoxidase (inibidores da MAO - IMAOs), aumentando a concentração dessas aminas na fenda sináptica e permitindo contato mais prolongado desses neurotransmissores com seus receptores pós-sinápticos (COLUZZI; MATTIA, 2005; HERSH et al., 2008). Atribui-se a ação analgésica desses fármacos a esse aumento da viabilidade de NA e 5-HT na fenda sináptica (participação no sistema descendente inibitório da dor), à ativação dos sistemas opioidérgicos endógenos, à ação em receptores de adenosina, inibição de receptores NMDA e nicotínicos, agindo tanto central quanto periféricamente (MICÓ et al., 2006; SAWYNOK et al., 2001; SAWYNOK, 2003).

Assim, segundo a literatura médica, o uso de antidepressivos é indicado em casos de dor crônica não-maligna, quando outros medicamentos falharam ou, ainda, se o paciente apresenta depressão como comorbidade associada à DTM (DIONNE, 1997). Os antidepressivos mais utilizados na terapêutica de dores crônicas são os antidepressivos tricíclicos (ADTs) e inibidores seletivos da recaptação de 5-HT (ISRS). Contudo, a analgesia proporcionada pelos ISRS é menos

consiste do que a analgesia proporcionada pelos ADTs (MCDERMOTT et al., 2006).

Doses de amitriptilina de 25, 50 e 75 mg produziram analgesia em quadros de dor orofacial crônica (SHARAV et al., 1987) e em pacientes com DTM caracterizada por dor crônica (PLESH et al., 2000; RIZZATTI-BARBOSA et al., 2003). Em modelos animais a amitriptilina também se mostrou agente analgésico eficaz. Foi capaz de reduzir a dor em modelo de OA em joelho de ratos nas doses de 3, 10 e 30 mg/kg no 14º, 21º e 28º dia após injeção de MIA (IVANAVICIUS et al., 2007).

Para tratamento da dor relacionada a OA em humanos, os antidepressivos duais são os mais indicados. Entre eles, a duloxetine é indicada para tratamento de OA com ou sem comorbidades associadas, principalmente depressão (BLOCK, 2014; MCALINDON et al., 2014). Em modelo de OA induzida por MIA em joelho de ratos, o antidepressivo dual milnaciprano demonstrou efeitos antinociceptivos tanto na fase dita precoce, quanto na fase tardia do modelo (BURNHAM; DICKENSON, 2013).

1.7 TRIPSINA E RECEPTORES PAR-2

As serino-proteases são encontradas em altos níveis no TGI e, além de sua função de degradação e/ou digestão de proteínas, também desempenham um papel de moléculas de sinalização através da regulação de funções celulares pela ativação de receptores acoplados à proteína G (GPCRs – do inglês, “G protein-coupled receptors”). Estes receptores ativados por proteases (PARs - do inglês, “protease-activated receptors”) compreendem o maior grupo de receptores no sistema de mamíferos (MACFARLANE et al., 2001; VERGNOLLE, 2004). As proteases clivam o receptor PAR, promovendo a formação de uma nova porção N-terminal, que por sua vez age como um ligante. Esta nova porção interage com a segunda alça extracelular do receptor clivado, ativando os segmentos transmembrana do receptor PAR, desencadeando uma cascata de segundos-mensageiros no interior da célula e alterando a função celular (MIIKE et al., 2001; ZHAO et al., 2014).

Dentre as serino-proteases, cita-se a tripsina. Produzida pelas células acinares do pâncreas, esta enzima é secretada no lúmen do intestino (duodeno), cuja principal função é a degradação de proteínas da ingesta alimentar. Em condições fisiológicas normais, pouca tripsina ativa é secretada pelo pâncreas, sendo o tripsinogênio (forma inativa da tripsina) o principal produto excretado pelo órgão em questão (DÉRY et al., 1998). Há, pelo menos, três genes distintos da tripsina em humanos: tripsina I e II e mesotripsina (a tripsina IV é uma variação da mesotripsina) (OSSOVSKAYA; BUNNETT, 2004). Atualmente, o principal uso da tripsina é na preparação de cultura de queratinócitos epidérmicos ou para divisão de células cultivadas *in vitro* (MEYER-HOFFERT et al., 2004). Além disso, sabe-se que a tripsina não é exclusiva do ambiente do TGI, pois também pode ativar receptores PAR após sua liberação por células cancerosas (DÉRY et al., 1998; LAM et al., 2012).

Atualmente são conhecidos quatro membros da família dos receptores PAR: PAR-1, PAR-2, PAR-3 e PAR-4. Sabe-se que os receptores PAR-1, PAR-3 e PAR-4 são ativados pela protease trombina (KWONG et al., 2010). A tripsina, por sua vez, ativa receptores do tipo PAR-2 e PAR-4, e ainda receptores PAR-1 (MIIKE et al., 2001). Contudo, para ativação deste último, doses mais elevadas da protease são necessárias (MEYER-HOFFERT et al., 2004). A tripsina pancreática constitui-se o agonista mais potente de receptores PAR-2 (DÉRY et al., 1998). A tripsina é capaz de ativar eosinófilos em humanos, modulando a liberação de mediadores inflamatórios (MIIKE et al., 2001); em ratos foi capaz de ativar queratinócitos induzindo a proliferação e inflamação epidérmica (MEYER-HOFFERT et al., 2004). Ainda, estudo conduzido em ratos demonstrou a relação da tripsina e ativação de receptores PAR-2 na ATM, revelando que o agonismo da protease no referido receptor induz quadro de alodinia mecânica e promove aumento de extravasamento plasmático e influxo de neutrófilos (DENADAI-SOUZA et al., 2010).

Receptores PAR-2 são expressos em humanos no TGI, leucócitos, endotélio, fígado, osteoblastos, sistema nervoso, rins e pulmão. Já em ratos, são encontrados principalmente em neurônios, TGI, leucócitos e rins (VERGNOLLE et al., 2001b; MACFARLANE et al., 2001). Sabe-se que as isoformas do receptor PAR-2 em humanos e camundongos compartilham 83% de similaridade, diferindo na

sequência do ligante N-terminal: SLIGKV para humanos e SLIGRL para camundongos (MACFARLANE et al., 2001). Esses peptídeos sintéticos mimetizam a ação de agonistas PAR-2, com o diferencial de não se fazer necessária a clivagem do receptor para sua ativação (DÉRY et al., 1998; VERGNOLLE et al., 2001b). Acredita-se que os receptores PAR-2 tenham função pró-inflamatória, como mediadores da nocicepção, e que exerçam um efeito protetivo de mucosa no TGI (KNECHT et al., 2007). Podem ainda ser ativados pela triptase secretada por mastócitos em resposta a estímulos inflamatórios (DÉRY et al., 1998; KWONG et al., 2010).

Sobre sua participação em eventos nociceptivos, os receptores PAR-1 e PAR-2 estão presentes em terminações nervosas sensoriais, onde sua ativação tem participação substancial na liberação de neuropeptídeos (como CGRP, SP e, possivelmente, neurocinina A – NKA) nessas terminações. Esses neuropeptídeos teriam colaboração na formação do edema pela vasodilatação provocada pelos mesmos no endotélio, devido ao aumento da permeabilidade vascular (VERGNOLLE et al., 2001b; OSSOVSKAYA; BUNNETT, 2004). 65% dos neurônios no gânglio da raiz dorsal de ratos expressam receptores PAR-2 (OSSOVSKAYA; BUNNETT, 2004). A ativação de receptores PAR-2 também pode culminar na estimulação de vias nociceptivas centrais, graças à excitação de neurônios espinais que modulariam a hiperalgesia observada após administração de agonistas PAR-2 (KNECHT et al., 2007; STEINHOFF et al., 2000). Ainda, os neurônios nociceptivos poderiam ser indiretamente sensibilizados pela ativação de receptores PAR-2, pois estes podem estimular outras células (células inflamatórias, endoteliais, entre outras) que promovem a liberação de mediadores inflamatórios (citocinas, prostaglandinas, serotonina, etc.) e a consequente sensibilização da terminação nervosa nociceptiva, possivelmente desencadeando o evento de hiperalgesia (KWONG et al., 2010; VERGNOLLE et al., 2001b).

1.7.1 Tripsina e Nervos vago

A possível relação existente entre tripsina e nervo vago pode ser sustentada pela presença dos principais receptores ativados por essa protease nas terminações nervosas aferentes desse nervo no TGI.

Receptores PAR-2 estão localizados nos terminais periféricos de aferentes mesentéricos e mioentéricos (onde há o estabelecimento de sinapses simpáticas e parassimpáticas, respectivamente) (KONG et al., 1997). Receptores PAR-1 e PAR-4 também podem ser encontrados em neurônios mioentéricos. Trombina, tripsina e triptase induzem, de maneira direta, a despolarização lenta e prolongada desse plexo nervoso, acompanhado por aumento na excitabilidade de suas terminações nervosas (GAO et al., 2002).

A tripsina regula enterócitos através da clivagem de receptores PAR-2 na membrana apical dessas células. Tal evento promove a formação de inositol-trifosfato e mobilização intracelular de cálcio, o que leva à liberação de AA e consequente formação de PGE_2 e prostaglandina $F_{1\alpha}$ ($PGF_{1\alpha}$), influenciando na motilidade, secreção (ambos efeitos protetivos) e neurotransmissão do TGI (DÉRY et al., 1998; KONG et al., 1997; OSSOVSKAYA; BUNNETT, 2004). Em estudo realizado em modelo de artrite induzida por CFA em ratos, Sant'ana (2013) verificou que a tripsina via oral foi capaz de reduzir a dor e a inflamação em animais com o ramo vagal subdiafragmático intacto, sugerindo a ativação de seus aferentes pela tripsina.

Em suma, a maior parte dos estudos envolvendo tripsina e receptores PAR relatam sua interação com o desencadeamento de eventos nociceptivos e inflamatórios. Todavia, havia no mercado um fármaco cujo princípio ativo era a tripsina, o Parenzyme®. Este medicamento foi lançado na década de 50 propondo uma ação anti-inflamatória para a protease em questão (BARNEY, 1967; INNERFIELD; ANGRIST; SCHWARZ, 1953), mas foi retirado de circulação há alguns anos atrás no Brasil. Contudo, na Alemanha ainda persiste uma combinação de tripsina e bromelaína (Phlogenzym) no mercado de fármacos. A literatura carece de pesquisas atuais sobre essa possível função da tripsina. Além disso, a relação tripsina-vago também deveria ser explorada para elucidar a possibilidade de interação entre eles e, talvez, favorecer o desenvolvimento de novos meios analgésicos, principalmente no tratamento de doenças articulares.

1.8 IODOACETATO MONOSSÓDICO COMO MODELO EXPERIMENTAL DE OSTEOARTRITE

Vários modelos animais têm sido usados para explorar a dor e a inflamação na ATM. Uma variedade de agentes alógenos compõem esses modelos como: óleo de mostarda (BONJARDIM et al., 2009), substância P (CARLESON et al., 1996), carragenina (RODRIGUES et al., 2006), CFA (HARPER et al., 2000, 2001; KERINS et al., 2005; KRAMER; BELLINGER, 2013a; THUT et al., 2007) e formalina (ARTHURI et al., 2005; ROVERONI et al., 2001; TING et al., 2007). Lesões osteoartíticas podem ser geradas pela injeção intra-articular de substâncias com ação sobre células articulares, como interleucina-1 e TNF- α (O'BYRNE et al., 1990), colagenase (KIKUCHI et al., 1998), papaína e iodoacetato monossódico (MIA) (VAN DER KRAAN et al., 1989).

Em busca de um modelo rápido e confiável que mimetizasse a histopatologia e sintomas associados à osteoartrite, o iodoacetato monossódico foi descrito pela primeira vez como modelo de OA por Kalbhen em 1987. O MIA caracteriza-se por inibir a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH – importante enzima na via glicolítica) e, portanto, a reação catalítica, resultando em desequilíbrio entre catabolismo e anabolismo dos condrócitos (COMBE et al., 2004). Isso leva à morte dessas células, alterações nos componentes da matriz extracelular (redução na quantidade de proteoglicanos) (JANUSZ et al., 2001) e consequente envolvimento e degeneração do osso subcondral, com instalação de alterações nociceptivas, além das patológicas (CIALDAI et al., 2013; GUZMAN et al., 2003a; IVANAVICIUS et al., 2007; POMONIS et al., 2005), em semelhança às lesões osteoartíticas humanas (BARVE et al., 2007; NAVEEN et al., 2014).

Segundo análise histológica, o MIA apresenta dois estágios. O primeiro estágio (dito agudo) é representado e mediado pelo infiltrado inflamatório no interior do fluido sinovial, com expansão da membrana sinovial devido à migração de células inflamatórias para a região. O clímax desse estágio parece ser no primeiro dia após a injeção do alógeno, e começa a reduzir a partir do terceiro dia. No sétimo dia, a resposta inflamatória parece ter resolução quase total e espera-se não mais compor a mediação da dor, representando o segundo estágio (dito crônico). Nesse estágio, dá-se início a alterações estruturais da articulação, ou seja, comprometimento do osso subcondral (BOVE et al., 2003; COMBE et al., 2004; GUZMAN et al., 2003; JANUSZ et al., 2001). Ainda, Rashid e colaboradores (2013) propõem a classificação do

modelo MIA em duas fases: precoce (a partir da primeira semana após a injeção do algógeno) e tardia (entre a 2ª e a 4ª semana após injeção do MIA).

Há vários estudos comprovando a eficácia do MIA como modelo de OA em joelho de (AHMED et al., 2012; BOVE et al., 2003; CHANDRAN et al., 2009; CIALDAI et al., 2013; GUINGAMP et al., 1997; KALFF et al., 2010; KELLY et al., 2012, 2013; MOHAN et al., 2011, 2013; MOON et al., 2012, 2013; NAGASE et al., 2012; RAHMAN et al., 2009). Todavia, uma avaliação farmacológica do modelo de MIA como indutor de lesão osteoartrítica na ATM, sob perspectiva de drogas mais usadas na terapia farmacológica clínica para tratamento desta patologia temporomandibular, ainda se revela necessária, pois não há estudos abordando essa temática.

A literatura traz três estudos mostrando que a injeção intra-articular de MIA em compartimento inferior, com ou sem assistência cirúrgica, desencadeou alterações histopatológicas e radiológicas associadas à OA na ATM de coelhos (CLEDES et al., 2006; DUYGU et al., 2011; GÜLER et al., 2011). No entanto, seu uso em ratos é relatado apenas por dois estudos. Wang e colaboradores (2012) avaliaram doses crescentes do algógeno no compartimento superior da ATM de ratos, verificando que a dose de 0,5 mg foi capaz de induzir alterações nos padrões fisiológicos (alteração molecular e degeneração cartilaginosa e óssea confirmada por avaliação histológica e radiológica) e nociceptivos (redução do limiar de retirada de cabeça), mimetizando a patologia osteoartrítica dessa articulação vista em humanos. Em 2013, o mesmo pesquisador e colaboradores analisaram o papel do estrogênio neste modelo e, constataram que o hormônio agrava a OA induzida pelo MIA na ATM pela indução da apoptose de condrócitos, sugerindo possível explicação para o dimorfismo sexual existente na OA temporomandibular ou nas DTMs.

Portanto, revela-se importante o estudo e a validação farmacológica do modelo de OA induzido por MIA na ATM de ratos, visto que esta espécie é a mais utilizada em estudos experimentais e farmacológicos, além de apresentar grande semelhança anatômica (ORSET, 2013) e fisiológica com a articulação humana (BARVE et al., 2007; NAVEEN et al., 2014). Isso favorece, também, o uso desse modelo para o desenvolvimento de novas drogas e/ou abordagens de tratamento, controle ou modificação da doença.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Caracterizar e validar farmacologicamente o modelo de osteoartrite induzida por MIA na ATM de ratos, por meio de drogas utilizadas na clínica para tratamento da dor relacionada à OA temporomandibular em humanos, segundo as diretrizes de tratamento da patologia.

2.2 Objetivos específicos

- Verificar a menor dose de MIA necessária para instauração de alterações nociceptivas relacionadas à ATM de ratos;
- Verificar se o teste de ingesta alimentar pode ser considerado método de avaliação do grau de comprometimento funcional e dor articular da ATM após injeção de MIA;
- Avaliar a resposta do modelo de OA induzida por MIA aos diferentes fármacos utilizados para tratamento da patologia em humanos, bem como a dose mais efetiva para tal;
- Avaliar o perfil de resposta farmacológico da tripsina via oral em modelo de osteoartrite, bem como verificar possível relação de ação envolvendo tripsina e ativação do nervo vago.

2.3 Hipóteses Nulas (H_0)

1) MIA não é capaz de induzir alterações comportamentais nociceptivas, bem como instaurar comprometimento articular levando ao prejuízo dos padrões de ingestão de alimento em ratos;

2) O modelo de OA induzida por MIA não responde à terapia farmacológica indicada para o tratamento da osteoartrite e à tripsina via oral;

3) A tripsina independe da integridade do nervo vago para exercer sua ação farmacológica.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Os procedimentos experimentais foram realizados com ratos da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, fêmeas, com idade aproximada de três meses e peso variando entre 180 – 230 gramas. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina (CCB, UFSC), e mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia ou no Biotério do Laboratório de Neurobiologia da Nocicepção (LANEN) até seu uso. Eles permaneceram sob condições controladas de temperatura ($21 \pm 1^\circ\text{C}$) e luz (ciclo claro-escuro de 12 horas), com água e ração *ad libitum*. Os experimentos foram realizados entre 8:00 e 16:00 horas, com ambientação prévia dos animais à sala de experimento por pelo menos uma hora. Esta pesquisa foi conduzida seguindo as diretrizes éticas estabelecidos pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP, 1983) e aprovada pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA) da UFSC (Protocolo: P00723).

3.2 Drogas

As drogas utilizadas nesse projeto estão listadas na Tabela 2, onde está descrito o nome do fármaco utilizado, seu laboratório e/ou marca do distribuidor de origem, dose, via de administração, veículo de diluição, volume administrado e tempo de administração anterior ao experimento.

Tabela 2: Drogas utilizadas nos protocolos.

Droga	Doses	Via de adm.	Veículo	Volume adm.	Tempo de trat.
Iodoacetato monossódico (Sigma, Brasil)	0,5; 1; 2 ou 3 mg	i.a.	Solução salina 0,9%*	50 µl	_____
Paracetamol (Valdequímica)	30 ou 45 mg/kg	v.o.	Solução salina 0,9%	1 ml/200 g	30 min
Dexametasona (Galena)	2,5; 4,6 ou 6,9 mg/kg	i.p.	Solução salina 0,9%	0,1 ml/100 g	1 h e 30 min
Naproxeno (Fragon)	30,9 ou 61,8 mg/kg	v.o.	CMC 0,4% + Tw80 0,2%**	1 ml/200 g	2 h
Celecoxibe (Celebra®, Pfizer LTDA)	6,3; 12,6 ou 25,1 mg/kg	v.o.	CMC 0,4%	1 ml/200 g	45 min
Sulfato de Morfina (Dimorf®, Cristália)	1; 2 ou 4 mg/kg	i.p.	Solução salina 0,9%	0,1 ml/100 g	30 min
Amitriptilina (Pharma Nostra)	1,5 ou 10,8 mg/kg	i.p.	Solução salina 0,9%	0,1 ml/100 g	30 min
Tripsina tipo II obtida do pâncreas suíno (Sigma)	0,75; 1,5; 2,95 ou 6 mg/ml	v.o.	Solução salina 0,9%	1 ml/200 g	24 h

i.a.: intra-articular; i.p.: intraperitoneal; v.o.: via oral; adm.: administração; trat.: tratamento.

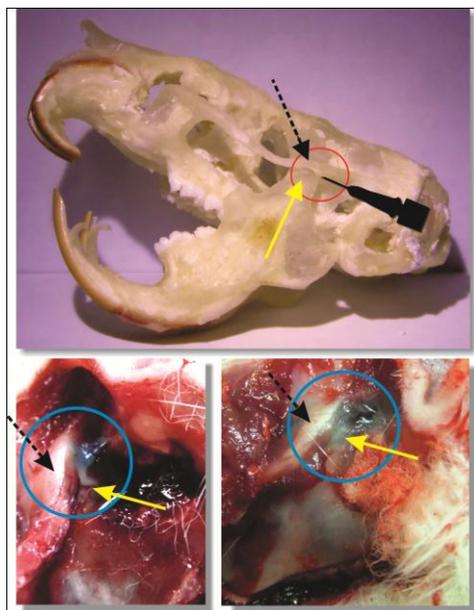
*Solução fisiológica de NaCl 0,9% (estéril).

**CMC: carboximetilcelulose; Tw80: Tween 80.

3.3 Injeção intra-articular de MIA

Os animais foram anestesiados por inalação através de isoflurano 2% (Isoforine®, Cristália) e, por meio de palpação, o arco zigomático e o côndilo da mandíbula foram localizados. A inserção da agulha (30 gauge; 8 mm) foi feita logo abaixo da borda pósterio-inferior do arco zigomático e avançada anteriormente até localizar a borda pósterio-lateral do côndilo da mandíbula. A injeção de MIA foi feita em um volume de 50 μ l no compartimento superior da cápsula articular, bilateralmente (BONJARDIM et al., 2009; DO NASCIMENTO; LEITE-PANISSI, 2014; GOMES et al., 2009; RODRIGUES et al., 2006; WANG et al., 2012b). O sítio de injeção foi primeiramente confirmado através da injeção de 50 μ l do corante azul de Evans no compartimento superior da ATM (Fig. 4) (WANG et al., 2012b).

Figura 4: Esquema do sítio e confirmação da injeção do MIA.



Representação da introdução da agulha após palpação do arco zigomático (seta pontilhada) e localização do côndilo mandibular (seta amarela) e injeção do algógeno no compartimento superior da ATM do rato (círculo). Fonte: próprio autor.

3.4 Protocolos experimentais

Os experimentos foram realizados sob condição de randomização das drogas e a divisão dos grupos seguiu distribuição de acordo com o ciclo estral dos animais no dia do experimento. A análise do ciclo estral procedeu-se através de lavado vaginal com solução salina estéril e posterior observação das células em microscópio ótico para verificação e classificação da fase do ciclo estral. Todos os experimentos foram analisados por um único experimentador treinado e cego para os grupos.

3.4.1 Observação comportamental nociceptiva

Os animais foram pré-expostos (ambientados) à caixa de observação (caixas de acrílico medindo 50 X 26 X 35 cm com espelho na parte inferior em 45°) um dia antes da injeção do MIA, durante 15 minutos.

Após a injeção do MIA, de acordo com o protocolo vigente, os animais foram submetidos à observação comportamental nociceptiva (OCN) na caixa de observação durante 30 minutos (análise de blocos de 3 minutos), registrando-se o número total de comportamentos nociceptivos (em segundos com auxílio de cronômetro digital). As sessões experimentais foram registradas em vídeo para posterior análise e os comportamentos foram expressos por meio de somatório da quantidade e/ou dos segundos despendidos em cada um. Os comportamentos nociceptivos mensurados foram os seguintes (Fig. 5):

- Chacoalhar de cabeça: movimentos intensos e rápidos de chacoalhar de cabeça. Para este comportamento, considerou-se a duração de 1 segundo para o mesmo. Dessa forma, foi computado o número total de chacoalhadas de cabeça durante 30 minutos e não tempo do comportamento (ARTHURI et al., 2005; BONJARDIM et al., 2009; HARTWIG et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2005; RODRIGUES et al., 2006; ROVERONI et al., 2001).

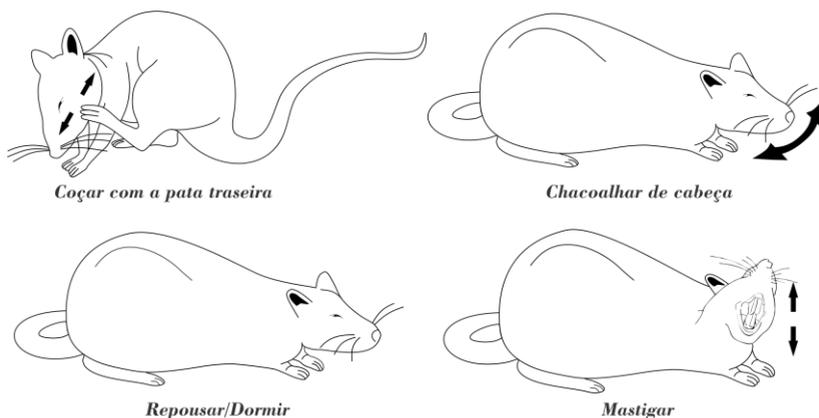
- Coçar com a pata traseira: foi considerado o tempo em segundos que o animal dispndia coçando a região temporomandibular

(AHN et al., 2005, 2007; BONJARDIM et al., 2009; HARTWIG et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2005; RODRIGUES et al., 2006).

- Mastigar: foram registrados movimentos vigorosos de mastigação em segundos (ARTHURI et al., 2005; GOMES et al., 2009; ROVERONI et al., 2001).

- Repousar/dormir: registrou-se o tempo, em segundos, que o animal permaneceu imóvel e/ou dormiu. Aceitou-se como característica para este comportamento a posição em que o animal repousasse sobre as quatro patas e a cauda estivesse completamente sobre o chão da caixa de observação (GOMES et al., 2009).

Figura 5: Ilustração dos comportamentos nociceptivos espontâneos analisados.



Comportamentos analisados durante 30 minutos na caixa de observação. Fonte: adaptado de Rifai, 2004.

3.4.2 Avaliação da ingestão alimentar

Para análise da ingestão alimentar, os animais foram separados em caixas individuais e mantidos com água *ad libitum*, mas em jejum por 15 horas. Após este período foi fornecida uma quantidade mínima

de ração (entre 30 e 35 gramas), pesada em balança de precisão, por um período de 2 horas. Durante esse período, os animais não tiveram acesso à água. A análise da quantidade ingerida pelo animal nesse intervalo de tempo foi feita no final das 2 horas do teste, através de pesagem da ração restante em balança de precisão e cálculo da diferença entre a quantidade de ração inicial e a quantidade final.

O teste de ingesta alimentar (IA) foi feito no dia 0 (anterior à injeção do MIA), 3, 7, 14 e 21 após a injeção do algógeno para avaliação da dose mais efetiva através de curva-dose-resposta. Para tal teste, a IA foi realizada antes do teste de OCN no Protocolo 1. Contudo, para verificar uma possível interferência do teste de IA nos comportamentos nociceptivos, outro teste foi realizado, onde a IA foi mensurada após os teste de OCN, ou seja, no oitavo dia (Protocolo 2). Assim, seguiu-se a padronização do Protocolo 2 para os testes farmacológicos subsequentes. Os animais individualizados em caixas, bem como os teste de IA, realizaram-se no Biotério do LANEN, a fim de se evitar qualquer variação de ambiente e ou temperatura.

3.4.3 Vagotomia subdiafragmática

Após anestesia com xilazina/cetamina (Sespo, Brasil) 1:1 (5 mg/kg e 90 mg/kg, respectivamente), na dose de 1,5 mg/kg intraperitoneal, os animais foram submetidos à cirurgia de vagotomia subdiafragmática. A cirurgia consiste em corte transversal no quadrante abdominal superior esquerdo, logo abaixo da primeira costela, a fim de expor o esôfago em sua porção subdiafragmática e, assim, exhibir os ramos subdiafragmáticos do nervo vago. A porção subdiafragmática vagal ventral e seus ramos (hepático, celíaco e gástrico anterior), bem como a porção subdiafragmática vagal dorsal e suas projeções (celíaco e gástrico posterior) foram seccionados. Após a cirurgia os animais receberam uma única dose de antibiótico (Shotapen[®], Virbac) e foram injetados com MIA na ATM de três a quatro dias após. Ainda, além dos grupos vagotomizados, neste protocolo foram utilizados grupos falso-operados (*sham*), ou seja, animais que passaram pelo procedimento cirúrgico, mas não tiveram a porção subdiafragmática vagal seccionada.

3.5 Cálculo de Extrapolação Alométrica

No intuito de reproduzir e verificar a eficácia das doses farmacológicas utilizadas na clínica para tratamento da OA temporomandibular, utilizou-se doses estabelecidas para humanos. Assim, para que as doses fossem ajustadas à espécie utilizada nesse trabalho, procedeu-se o Cálculo de Extrapolação Alométrica (como descrito por Pachaly, 2006).

A extrapolação alométrica consiste em comparação matemática entre as massas de diferentes animais, colocando-os dentro do mesmo padrão numérico, permitindo calcular doses e frequências de administração para diferentes espécies a partir de uma dose-referência já conhecida. Este cálculo leva em consideração a taxa metabólica basal (TMB - mg kcal^{-1}), valor correspondente aos padrões fisiológicos quando o espécime encontra-se em inércia. A TMB é calculada através da massa do animal e uma constante de proporcionalidade (k) pré-estabelecida com base em trabalhos realizados por Kleiber nas décadas de 30 e 40, equivalente às quilocalorias utilizadas por alguma espécie durante um período de 24 horas. Para mamíferos placentários (incluindo o homem e roedores), a constante de proporcionalidade é $K=70$ (FREITAS; CARREGARO, 2013; PACHALY, 2006).

$$\text{TMB} = K \times M^{0,75}$$

K: constante teórica de proporcionalidade.

M: massa em kg.

Dessa forma, o cálculo de extrapolação alométrica é composto da TMB do animal modelo (homem) dividida pela dose total indicada (em mg) para este e, o resultado é multiplicado pela TMB do animal alvo (rato). Por fim, divide-se o resultado obtido pelo peso do animal alvo e, dessa maneira, tem-se a dose total para o animal alvo em quilogramas. A fórmula da extrapolação alométrica está representada abaixo.

$$DT_A = \frac{[DT_M \div TMB_M] \times TMB_A}{Peso_A} = mg/kg_A$$

DT_A : dose total do animal alvo (mg/kg).

DT_M : dose total do animal modelo (mg/kg).

TMB_A : taxa metabólica basal do animal alvo (mg kcal⁻¹).

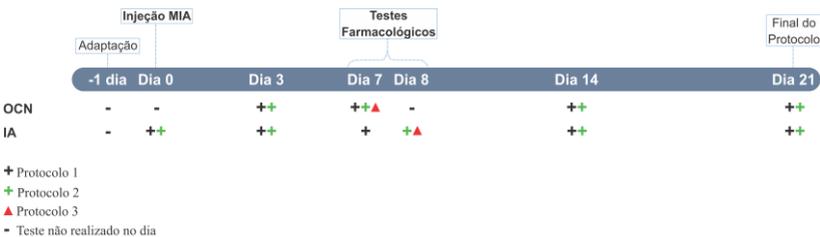
TMB_M : taxa metabólica basal do animal modelo (mg kcal⁻¹).

$Peso_A$: peso do animal alvo (kg).

3.6 Desenho experimental

O protocolo experimental geral está representado na Figura 6. Basicamente, pôde-se dividir o projeto em três protocolos:

Figura 6: Desenho experimental geral.



Representação do protocolo de 21 dias para os experimentos de CDR-MIA (Protocolo 1) e IA após testes de OCN (Protocolo 2); e análise do sétimo e oitavo dias para os experimentos CDR-fármacos (Protocolo 3).

PROTOCOLO 1: Curva dose-resposta MIA (CDR-MIA)

Em um primeiro momento, realizou-se o experimento de curva dose-resposta para o MIA. Os testes de OCN e IA compuseram o protocolo de 21 dias para as quatro doses testadas (0,5; 1; 2 e 3 mg), sendo que a IA foi analisada no mesmo dia e precedendo o teste de

OCN. O grupo controle representava a injeção de solução salina 0,9% na ATM em um volume de 50 μ l, bilateralmente. O mesmo animal passou pelos dois testes.

PROTOCOLO 2: IA após teste de OCN

Para verificar uma possível interferência do teste de IA nos comportamentos nociceptivos analisados na OCN, devido à estimulação funcional da articulação, repetiu-se o protocolo de 21 dias, mas desta vez com o teste de IA realizado após o teste de OCN e somente com a menor dose responsiva verificada no experimento CDR-MIA, ou seja, a dose de 0,5 mg de MIA. Novamente o grupo controle era representado pela injeção de solução salina 0,9% na articulação, bilateralmente, e o mesmo animal era analisado em ambos os testes.

PROTOCOLO 3: Curva dose-resposta fármacos (CDR-fármacos)

Baseando-se na literatura de que o sétimo dia representaria fase crônica do modelo de OA induzida por MIA, padronizou-se esse dia para a realização dos testes de OCN do protocolo de CDR-fármacos. Contudo, o teste de IA foi analisado no oitavo dia, de acordo com o Protocolo 2. Para os experimentos do protocolo em questão, o grupo controle era representado pela injeção bilateral de MIA (0,5 mg) na ATM, sem nenhum tipo de tratamento. O tempo de administração pré-teste dos fármacos está descrito na Tabela 2.

3.7 Análises estatísticas

Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão (E.P.M.) ou mediana (mínimo e máximo), com intervalo de confiança de 95%. As análises estatísticas dos dados foram realizadas por meio do programa *IBM SPSS Statistics 20*[®] e a confecção dos gráficos procedeu-se por meio do programa *GraphPad Prism 5*[®]. Testes de Levene e Shapiro-Wilk foram usados para verificar a homogeneidade de variância e distribuição dos dados, respectivamente. Sendo assim, os

resultados que apresentaram homogeneidade de variância e distribuição normal foram analisados segundo teste de análise de variância (ANOVA) de duas vias com medidas repetidas (seguido do teste de *post-hoc* de Bonferroni) ou de uma via (seguido de teste *post-hoc* de Tukey). Os testes de Friedman de duas vias com medidas repetidas e Kruskal-Wallis de uma via foram usados para análise de dados não-paramétricos. O teste de IA foi apresentado como Média de Winsor. Valores de p menores que 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados como indicadores de significância.

4 RESULTADOS

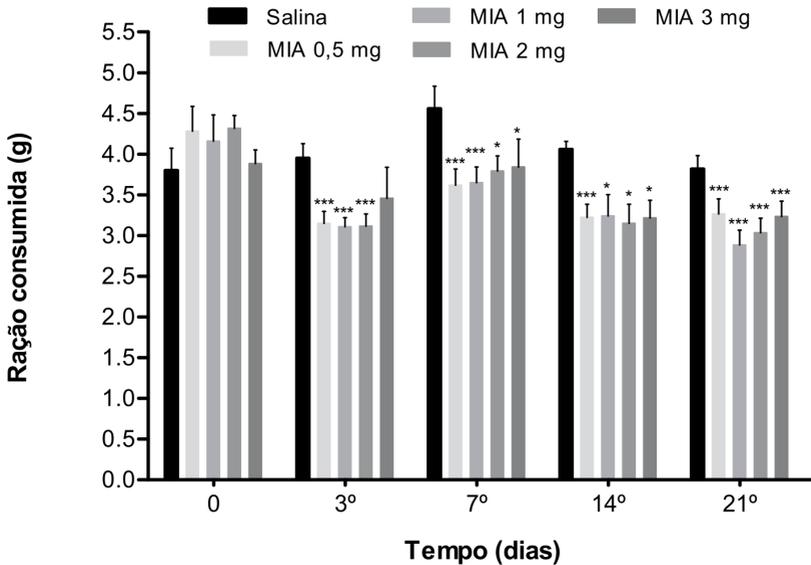
4.1 Osteoartrite induzida pelo MIA – Curva dose-resposta (Protocolo 1)

O teste de IA revelou uma redução na quantidade de ração ingerida nos animais que receberam a injeção de MIA (Fig. 7). Com exceção da dose de 3 mg, as outras doses (0,5; 1 e 2 mg de MIA) foram capazes de diminuir a ingesta alimentar a partir do 3º ($p < 0,0001$) dia de maneira expressiva, seguindo este padrão até o 21º dia se comparado com o grupo controle (injeção intra-articular de solução salina 0,9% na ATM, bilateralmente) ($p < 0,0001$). A dose de 3 mg de MIA foi capaz de diminuir o padrão alimentar a partir do 7º dia ($p < 0,05$). Os padrões para o grupo controle começam a retornar a sua normalidade a partir do 14º dia, o mesmo observa-se nos grupos MIA, contudo esse retorno refere-se ao padrão apresentado no 3º dia.

Os gráficos do teste de OCN foram agrupados para melhor visualização e comparação do desfecho temporal de cada comportamento. Assim, as doses de MIA foram capazes de induzir o comportamento de coçar com a pata traseira (Fig. 8A), aumentando o tempo despendido pelo animal na realização do mesmo ($p < 0,05$). Este aumento teve início no 3º dia e sustentou-se até o 21º dia. O comportamento de chacoalhar de cabeça também apresentou aumento desde o primeiro dia do protocolo e se sustentou até o último ($p < 0,05$) (Fig. 8B). Apenas as doses de 2 e 3 mg foram responsivas no 3º dia, contudo a partir do 7º dia, todas as doses aumentaram significativamente o número de chacoalhadas de cabeça (levando-se em consideração que cada chacoalhada tinha a duração de 1 segundo).

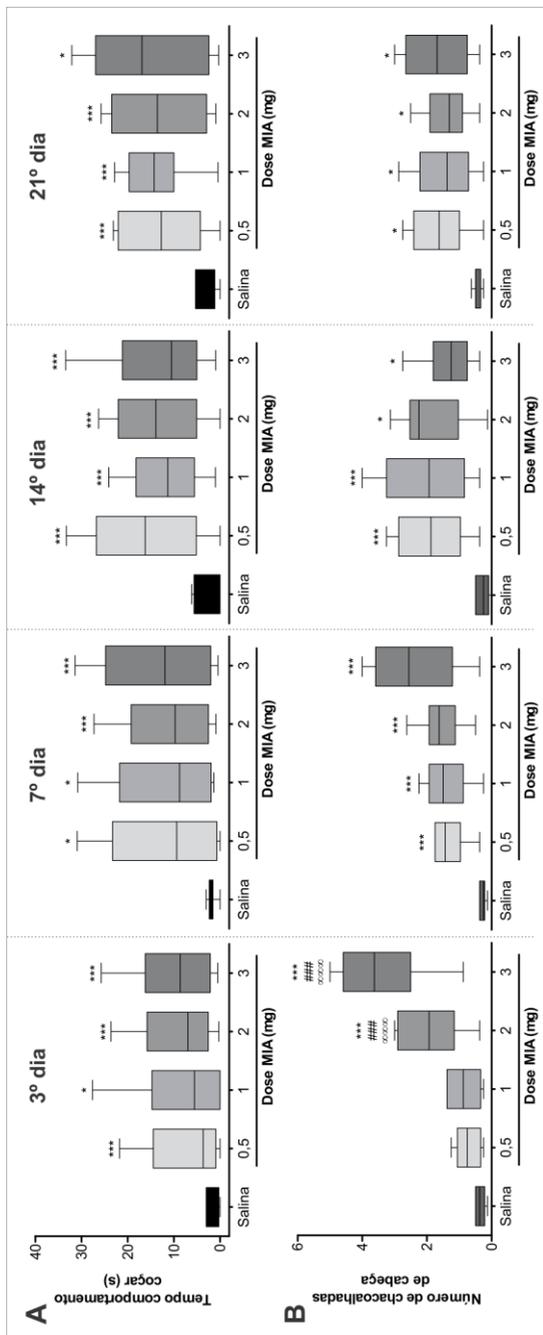
Ainda, todas as doses de MIA foram capazes de diminuir o comportamento de repousar/dormir (Fig. 9A) no primeiro dia do protocolo ($p < 0,0001$). No entanto, somente as doses de 0,5 e 2 mg sustentaram essa diminuição no 7º dia ($p < 0,0001$) e, a partir do 14º dia, nenhuma das doses foi capaz de alterar esse comportamento. Por fim, nesse protocolo, o comportamento de mastigar não sofreu alteração significativa por nenhuma das doses durante os 21 dias de análise (Fig. 9B).

Figura 7: Avaliação temporal da ingestão alimentar do Protocolo 1.



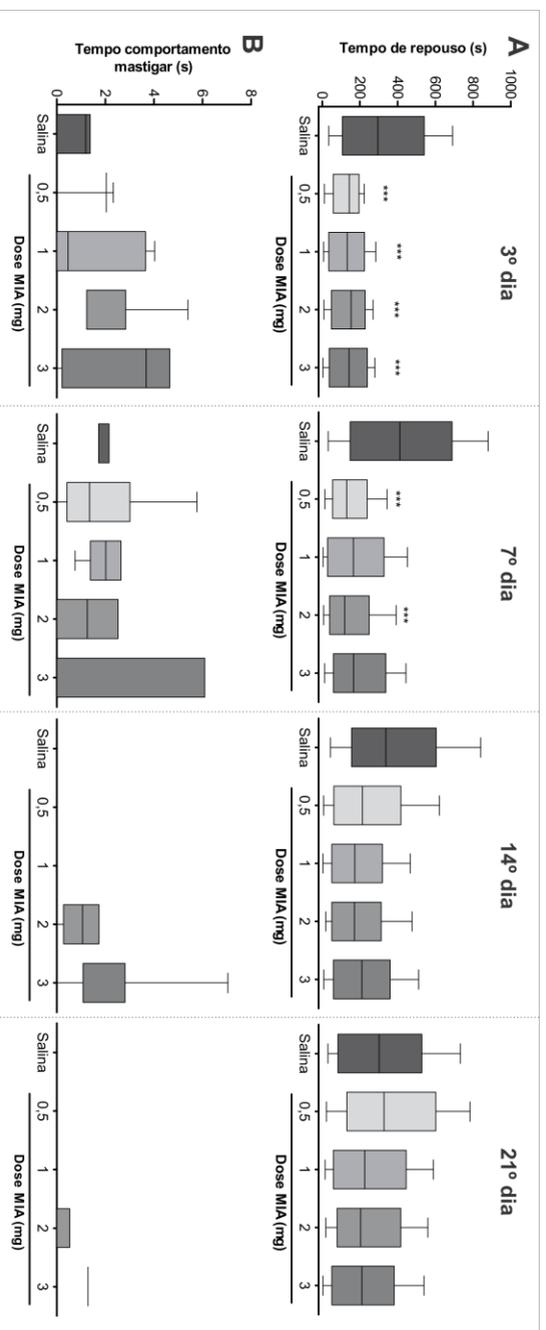
As doses de 0,5; 1 e 2 mg de MIA na ATM foram capazes de diminuir a quantidade de ração ingerida a partir do 3º dia, sustentando esta alteração até o 21º dia. A dose de 3 mg de MIA apresentou diferença significativa apenas a partir do 7º dia. Os pontos das curvas representam a média \pm E.P.M. (n= 12). *representa diferença significativa em relação ao grupo controle (salina i.a.) em cada dia da análise (*p < 0,05; ***p < 0,0001). ANOVA de duas vias com medidas repetidas (comparações múltiplas de Bonferroni).

Figura 8: Perfil temporal da injeção intra-articular de diferentes doses de MIA na ATM (Protocolo 1 - Coçar e Chacoalhar).



As análises para os comportamentos de coçar com a pata traseira (A) e chacoalhar de cabeça (B) foram realizadas durante 21 dias. As barras representam a mediana (mínimo e máximo) dos segundos despendidos pelos animais no comportamento de coçar com a pata traseira no gráfico A e do número de chacoalhadas de cabeça no gráfico B durante 30 minutos (n = 8). As doses estão representadas no eixo X. * indica diferença estatística entre a dose de MIA i.a. e o grupo controle (salina i.a.) em cada dia da análise (*p < 0,05; **p < 0,0001); # estatisticamente diferente da dose de 0,5 mg de MIA (### = p < 0,0001); ∞ diferença estatística da dose de 1 mg de MIA (∞∞∞∞ = p < 0,0001). Teste de Friedman de duas vias com medidas repetidas.

Figura 9: Perfil temporal da injeção intra-articular de diferentes doses de MIA na ATM (Protocolo 1 – Repousar/Dormir e Mastigar).



As análises para os comportamentos de repousar/dormir (A) e mastigar (B) foram realizadas durante 21 dias. As barras representam a mediana (mínimo e máximo) dos segundos despendidos pelos animais em cada comportamento durante 30 minutos (n= 8). As doses estão representadas no eixo X. * indica diferença estatística entre a dose de MIA e o grupo controle (salina i.a.) em cada dia da análise (***) $p < 0,0001$). Teste de Friedman de duas vias com medidas repetidas.

4.2 Teste de IA após os testes de OCN (Protocolo 2)

Para o Protocolo 2, tomou-se como padrão a menor dose capaz de induzir alterações comportamentais nociceptivas de acordo com os resultados do Protocolo 1, ou seja, a dose de 0,5 mg de MIA. Novamente o grupo controle foi representado pela injeção intra-articular de solução salina 0,9% em ambas as articulações (direita e esquerda).

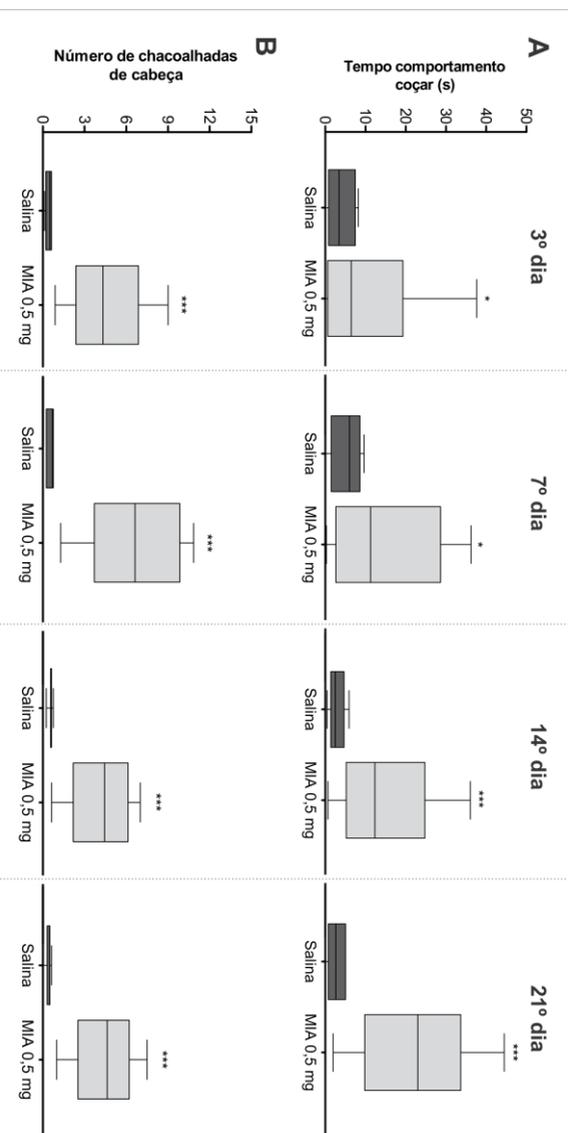
A dose de 0,5 mg foi capaz de aumentar o tempo despendido pelos animais no comportamento de coçar com a pata traseira, seguindo os padrões do teste de CDR-MIA ($p < 0,05$) (Fig. 10A). Esse aumento apresentou significância estatística, quando comparado ao grupo controle (salina i.a.), desde o 3º dia e se manteve até o último dia do protocolo (21º dia). O mesmo observou-se quanto ao comportamento de chacoalhar de cabeça, onde a dose de 0,5 mg de MIA elevou o número de chacoalhadas no decorrer dos dias analisados ($p < 0,0001$) quando comparado ao grupo controle (Fig. 10B).

Por fim, o comportamento de repousar/dormir do grupo 0,5 mg de MIA apresentou menor duração no total dentro do tempo de 30 minutos em todos os dias do protocolo experimental, quando comparado ao grupo controle ($p < 0,0001$) (Fig. 11A). No entanto, a dose de 0,5 mg foi capaz de alterar o comportamento de mastigar, levando a aumento no tempo em que o animal permaneceu realizando essa ação, o que não aconteceu no Protocolo 1 (Fig. 11B), tanto no 3º ($p = 0,008$) quanto no 7º dia ($p < 0,0001$).

Em relação à ingestão alimentar, a dose de 0,5 mg de MIA manteve o padrão revelado pelo Protocolo 1, ou seja, reduziu a quantidade de ração ingerida em comparação ao grupo controle ($p < 0,05$) (Fig. 12). Essa redução foi estatisticamente diferente em todos os dias do protocolo.

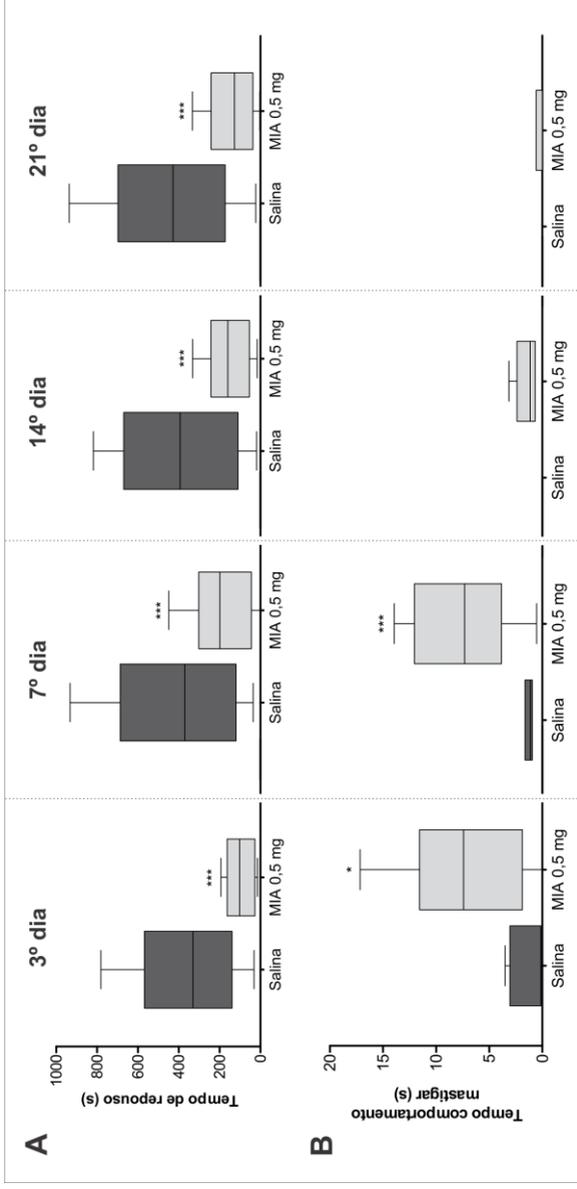
Dessa forma, observou-se que no Protocolo 2, o tempo despendido e/ou a quantidade (chacoalhar de cabeça) dos comportamentos apresentou médias maiores ou menores (no caso do comportamento de repousar/dormir), além de ter essas alterações sustentadas durante todo o ciclo temporal desse protocolo (com exceção do comportamento de mastigar), quando o teste de IA foi realizado após os testes de OCN.

Figura 10: Perfil temporal da injeção intra-articular da dose de 0,5mg de MIA na ATM sem teste de IA precedendo os testes de OCN (Protocolo 2 – coçar e chacoalhar).

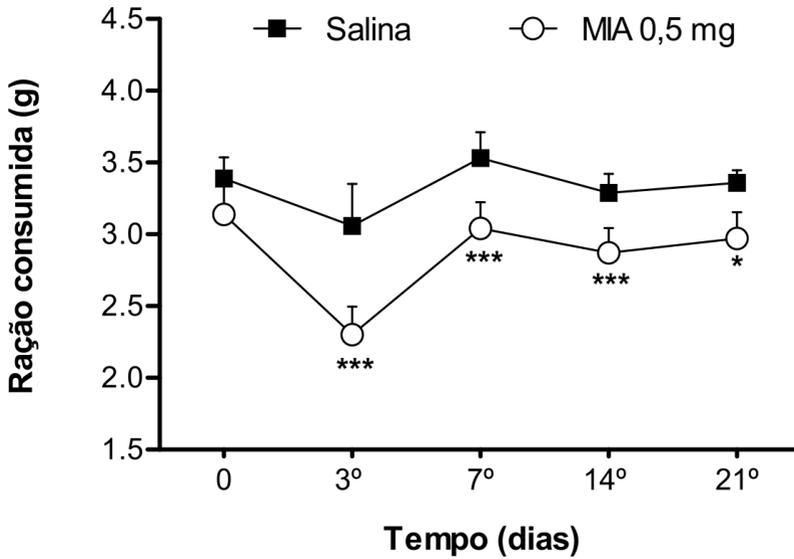


As análises para os comportamentos de coçar com a pata traseira (A) e chacoalhar de cabeça (B) foram realizadas durante 21 dias. As barras representam a mediana (mínimo e máximo) dos segundos despendidos pelos animais no comportamento de coçar no gráfico A e do número de chacoalhadas de cabeça no gráfico B durante 30 minutos (n= 8). * indica diferença estatística entre o grupo MIA 0,5mg e o grupo controle (salina i.a.) em cada dia da análise (*p < 0,05; ***p < 0,0001). Teste de Friedman de duas vias com medidas repetidas.

Figura 11: Perfil temporal da injeção intra-articular da dose de 0,5 mg de MIA na ATM sem teste de IA precedendo os testes de OCN (Protocolo 2).



As análises para os comportamentos de repousar/dormir (A) e mastigar (B) foram realizadas durante 21 dias. As barras representam a mediana (mínimo e máximo) dos segundos despendidos pelos animais em cada comportamento durante 30 minutos (n= 8). * indica diferença estatística entre o grupo MIA 0,5 mg e o grupo controle (salina i.a.) em cada dia da análise (* p < 0,05; *** p < 0,0001). Teste de Friedman de duas vias com medidas repetidas.

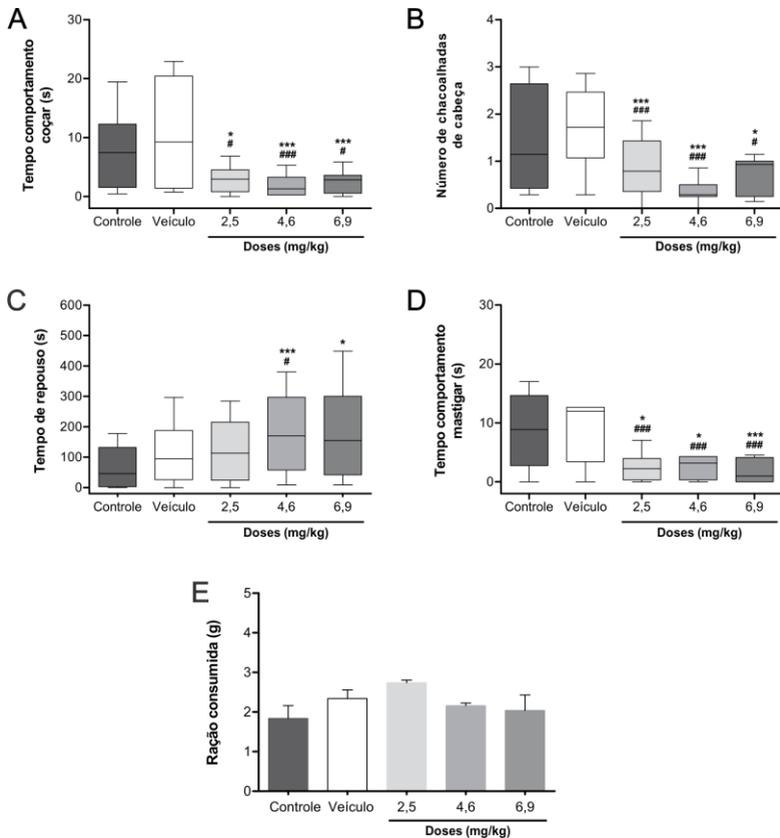
Figura 12: Avaliação temporal da ingesta alimentar (Protocolo 2).

A dose de 0,5 mg de MIA na ATM foi capaz de diminuir a quantidade de ração ingerida a partir do 3º dia, sustentando esta alteração até o 21º dia. Os pontos das curvas representam a média \pm E.P.M. (n= 10). *representa diferença significativa em relação ao grupo controle (salina i.a.) em cada dia da análise (*p < 0,05; ***p < 0,0001). ANOVA de duas vias com medidas repetidas (comparações múltiplas de Bonferroni).

4.3 Curva dose-resposta dos fármacos (Protocolo 3)

4.3.1 DEXAMETASONA

A administração de dexametasona intraperitoneal (1 h e 30 min antes do teste de OCN) foi capaz de reduzir o tempo dos comportamentos nociceptivos analisados (Fig. 13). As doses de 4,6 e 6,9 mg/kg ($p < 0,05$) reduziram o tempo e/ou o número de todos os comportamentos analisados, quando comparado ao o grupo controle (MIA + sem tratamento) e grupo veículo (MIA + salina i.p.). Contudo, a dose de 2,5 mg/kg apenas diminuiu os tempos dos comportamentos de coçar com a pata traseira, mastigar ($p < 0,05$) e o número de chacoalhadas de cabeça ($p < 0,0001$) (Fig. 13A, D e B, respectivamente), porém não elevou o tempo de repousar/dormir como as demais doses (Fig. 13C). No teste de IA, nenhuma das três doses testadas foi capaz de elevar a quantidade de ração ingerida no oitavo dia (Fig. 13E).

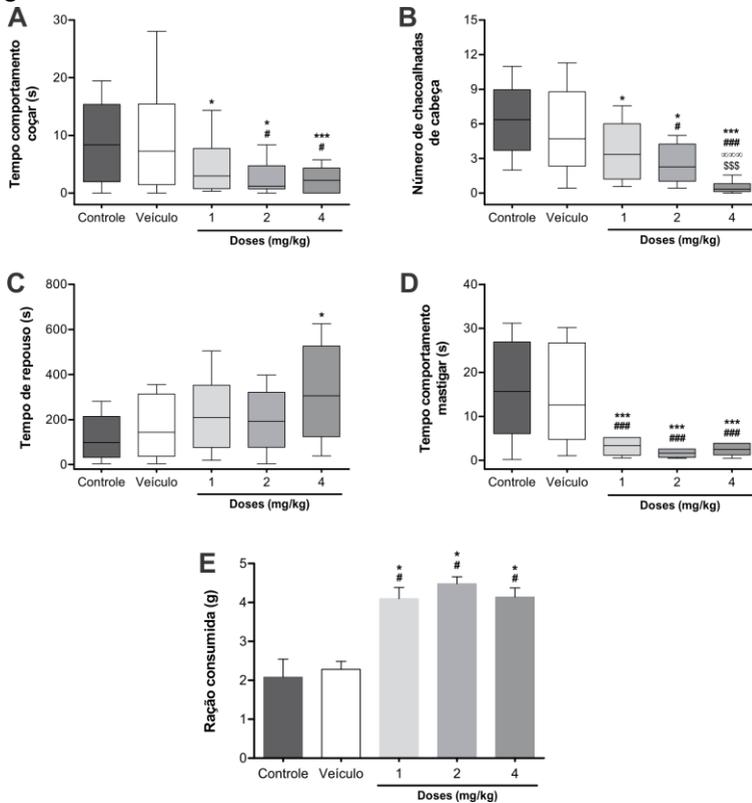
Figura 13: Efeito da dexametasona sobre os testes de OCN e IA.

Avaliação do sétimo e oitavo dia, respectivamente, após injeção de 0,5 mg de MIA na ATM esquerda e direita. Nos gráficos estão representados os grupos experimentais: controle (MIA + sem tratamento); veículo (MIA + salina i.p.); dexametasona 2,5 (MIA + 2,5 mg/kg de dexametasona i.p.); dexametasona 4,6 (MIA + 4,6 mg/kg de dexametasona i.p.) e dexametasona 6,9 (MIA + 6,9 mg/kg de dexametasona i.p.). As barras representam a mediana (mínimo e máximo) dos tempos e/ou número dos comportamentos de coçar com a pata traseira (A), chacoalhar de cabeça (B), repouso/dormir (C) e mastigar (D) durante 30 minutos ($n=7$); e/ou média \pm E.P.M. da quantidade de ração ingerida em gramas (E) ($n=5$). * indica diferença estatística em relação ao grupo controle (* $p < 0,05$; *** $p < 0,0001$); # representa diferença estatística em relação ao grupo veículo (# = $p < 0,05$; ### = $p < 0,0001$). Kruskal-Wallis de uma via (ANOVA) (A, B, C e D); ANOVA de uma via seguido do teste de *post-hoc* de Tukey (E).

4.3.2 MORFINA

A injeção intraperitoneal de morfina (30 min antes do teste de OCN) apresentou efeito analgésico por meio da redução do número e/ou tempo despendido pelo animal nos comportamentos nociceptivos analisados. Assim, as três doses (1, 2 e 4 mg/kg) foram capazes de reverter os comportamentos nociceptivos de coçar com a pata traseira ($p < 0,05$), mastigar ($p < 0,0001$) e chacoalhar de cabeça ($p < 0,05$) (Fig. 14A, B e D, respectivamente), quando comparado ao grupo controle (MIA + sem tratamento) e grupo veículo (MIA + salina i.p.). Ainda, a dose de 4 mg/kg apresentou diferença significativa em relação às doses de 1 e 2 mg/kg na redução do número de chacoalhadas de cabeça ($p < 0,0001$) e foi a única a responder no comportamento de repousar/dormir em relação ao grupo controle, aumentando o tempo despendido pelo animal nesse comportamento ($p = 0,004$) (Fig. 14C).

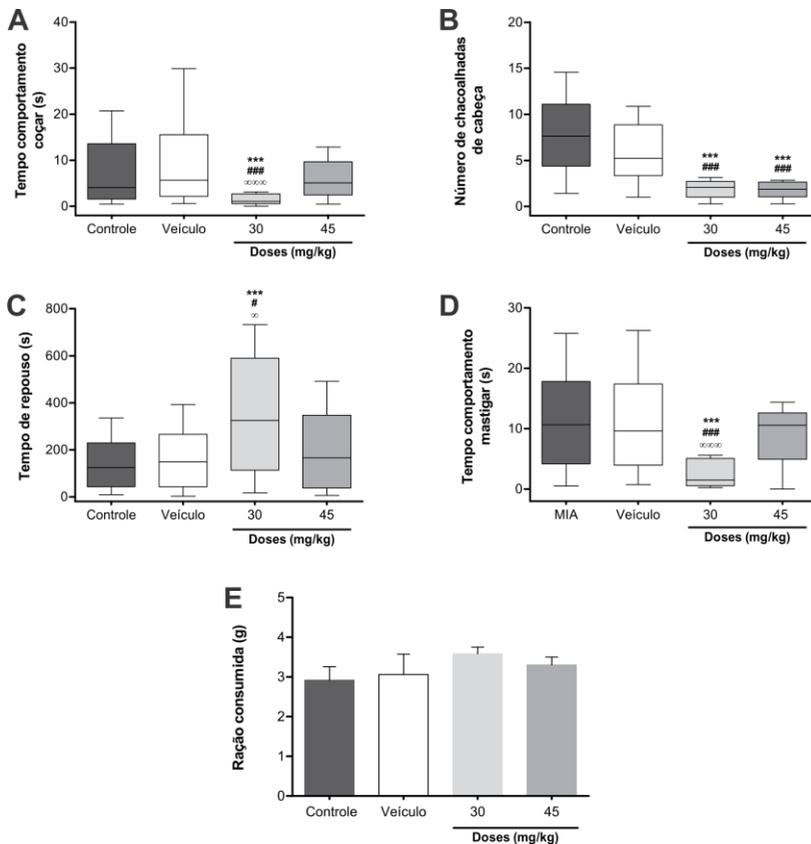
No teste de IA, novamente as três doses de morfina (1, 2 e 4 mg/kg – 30 min antes do teste) demonstraram diferença estatística significativa, aumentando expressivamente a quantidade de ração ingerida quando comparado ao grupo controle e veículo ($p < 0,05$) (Fig. 14E).

Figura 14: Efeito da morfina sobre os testes de OCN e IA.

Avaliação do sétimo e oitavo dia, respectivamente, após injeção bilateral de 0,5 mg de MIA na ATM. Nos gráficos estão representados os grupos experimentais: controle (MIA + sem tratamento); veículo (MIA + salina i.p.); morfina 1 (MIA + 1 mg/kg de morfina i.p.); morfina 2 (MIA + 2 mg/kg de morfina i.p.) e morfina 4 (MIA + 4 mg/kg de morfina i.p.). As barras representam a mediana (mínimo e máximo) dos tempos e/ou número dos comportamentos de coçar com a pata traseira (A), chacoalhar de cabeça (B), repousar/dormir (C) e mastigar (D) durante 30 minutos (n=7 ou 6); e/ou média \pm E.P.M. da quantidade de ração ingerida em gramas (E) (n=5). * indica diferença estatística em relação ao grupo controle (*p < 0,05; ***p < 0,0001); # e ∞ representam diferença estatística em relação ao grupo veículo e à dose de 1 mg/kg, respectivamente (# = p < 0,05; ### e $\infty\infty\infty$ = p < 0,0001); \$ indica diferença significativa em relação à dose de 2 mg/kg (\$\$\$ = p < 0,0001). Kruskal-Wallis de uma via (ANOVA) (A, B, C e D); ANOVA de uma via seguido do teste de *post-hoc* de Tukey (E).

4.3.3 PARACETAMOL

A administração de paracetamol via oral (30 min antes do teste de OCN) foi capaz de reduzir os comportamentos nociceptivos do teste de OCN. Contudo, somente a dose de 30 mg/kg foi responsiva para todos os comportamentos ($p < 0,05$), em relação ao grupo controle (MIA + sem tratamento) e grupo veículo (MIA + salina v.o.), diferindo estatisticamente inclusive da dose de 45 mg/kg nos comportamentos de coçar com a pata traseira ($p < 0,0001$), mastigar ($p < 0,0001$) e repousar/dormir ($p = 0,006$) (Fig. 15A, D e C, respectivamente). Já a dose de 45 mg/kg reduziu somente o número de chacoalhadas de cabeça ($p < 0,0001$) (Fig. 15B). No teste de IA, nem a dose de 30 mg/kg ou a dose de 45 mg/kg (administradas 30 min antes do teste) apresentou diferença estatística na quantidade de ração ingerida (Fig. 15E).

Figura 15: Efeito do paracetamol sobre os testes de OCN e IA.

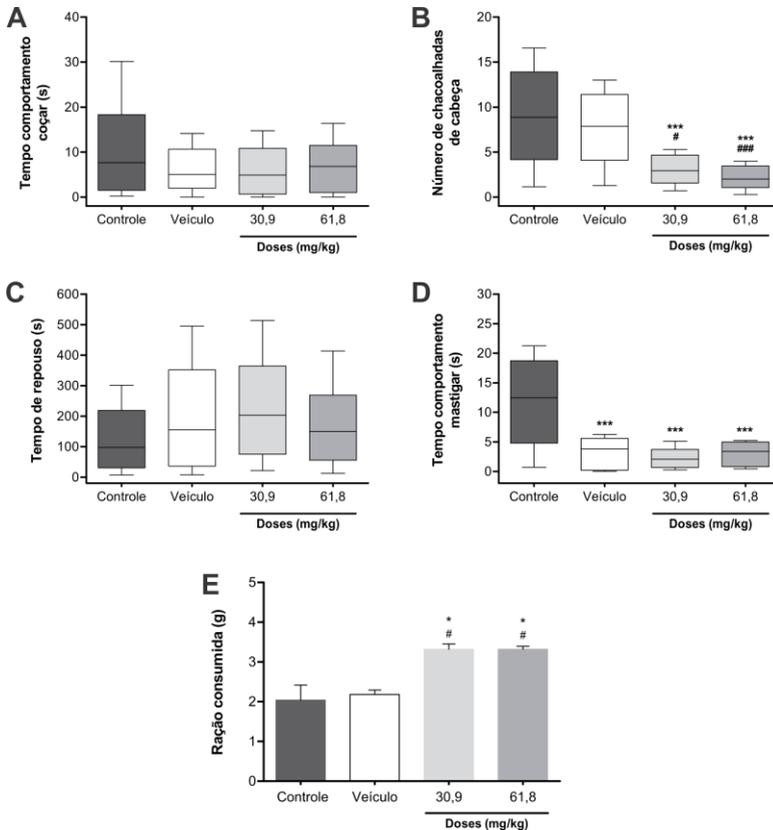
Avaliação do sétimo e oitavo dia, respectivamente, após injeção de 0,5 mg de MIA na ATM, bilateralmente. Nos gráficos estão representados os grupos experimentais: controle (MIA + sem tratamento); veículo (MIA + salina v.o.); paracetamol 30 (MIA + 30 mg/kg de paracetamol v.o.) e paracetamol 45 (MIA + 45 mg/kg de paracetamol v.o.). As barras representam a mediana (mínimo e máximo) dos tempos e/ou número dos comportamentos de coçar com a pata traseira (A), chacoalhar de cabeça (B), repousar/dormir (C) e mastigar (D) durante 30 minutos (n=7); e/ou média \pm E.P.M. da quantidade de ração ingerida em gramas (E) (n= 5). * indica diferença estatística em relação ao grupo controle (**p < 0,0001); # representa diferença estatística em relação ao grupo veículo (### = p < 0,0001); ∞ indica diferença estatística em relação à dose de 45 mg/kg ($\infty\infty\infty$ = p < 0,0001). Kruskal-Wallis de uma via (ANOVA) (A, B, C e D); ANOVA de uma via seguido do teste de *post-hoc* de Tukey (E).

4.3.4 NAPROXENO

As doses de 30,9 e 61,8 mg/kg de naproxeno via oral administradas 2 horas antes do teste de OCN foram capazes de reduzir somente o número de chacoalhadas de cabeça ($p < 0,05$) e o tempo do comportamento de mastigar ($p < 0,0001$) (Fig. 16B e D, respectivamente). Contudo, não demonstraram redução no tempo despendido nos comportamentos de coçar com a pata traseira ou aumento no tempo de repousar/dormir (Fig. 16A e C, respectivamente). Ainda, o grupo veículo (MIA + CMC 0,4% e Tw80 0,2%) também demonstrou diferença significativa em relação ao grupo controle no tempo do comportamento de mastigar ($p < 0,0001$) (Fig. 16D).

Na análise da ingesta alimentar, ambas as doses (30,9 e 61,8 mg/kg, v.o. – 2 horas pré-teste) aumentaram significativamente a quantidade de ração ingerida em relação ao grupo controle e grupo veículo ($p < 0,05$) (Fig. 16E).

Figura 16: Efeito do naproxeno sobre os testes de OCN e IA.



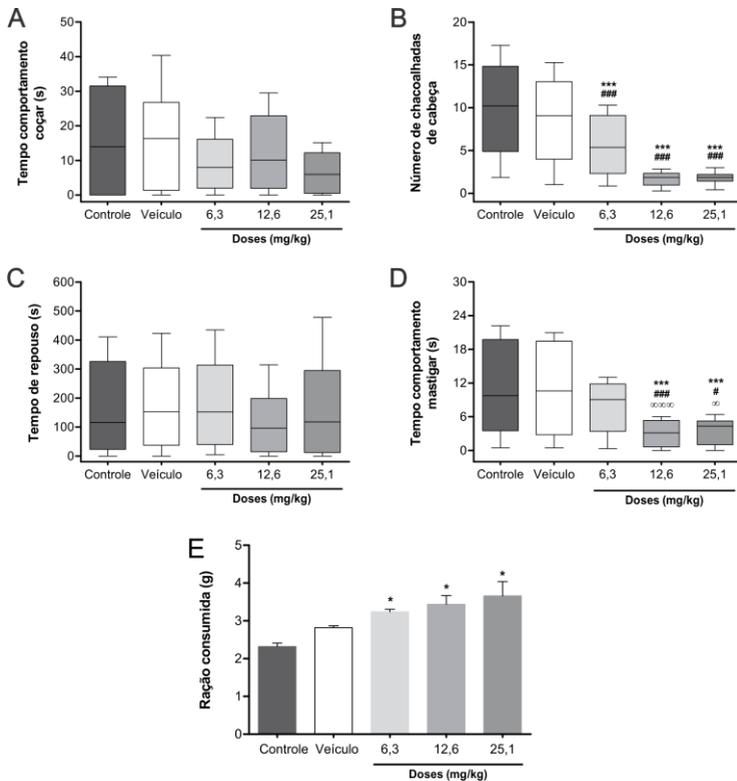
Avaliação do sétimo e oitavo dia, respectivamente, após injeção bilateral de 0,5 mg de MIA na ATM. Nos gráficos estão representados os grupos experimentais: controle (MIA + sem tratamento); veículo (MIA + CMC 0,4% e Tw80 0,2% v.o.); naproxeno 30,9 (MIA + 30,9 mg/kg de naproxeno v.o.) e naproxeno 61,8 (MIA + 61,8 mg/kg de naproxeno v.o.). As barras representam a mediana (mínimo e máximo) dos tempos e/ou número dos comportamentos de coçar com a pata traseira (A), chacoalhar de cabeça (B), repousar/dormir (C) e mastigar (D) durante 30 minutos (n=7 ou 6); e/ou média \pm E.P.M. da quantidade de ração ingerida em gramas (E) (n=5). * indica diferença estatística em relação ao grupo controle (* $p < 0,05$; *** $p < 0,0001$); # representa diferença estatística em relação ao grupo veículo (# = $p < 0,05$; ### = $p < 0,0001$). Kruskal-Wallis de uma via (ANOVA) (A, B, C e D); ANOVA de uma via seguido do teste de *post-hoc* de Tukey (E). CMC: carboximetilcelulose 0,4%; Tw80: Tween 80 0,2%.

4.3.5 CELECOXIBE

A administração via oral, 45 minutos antes do teste de OCN, das doses de celecoxibe (6,3; 12,6 e 25,1 mg/kg) seguiram o mesmo padrão do anti-inflamatório naproxeno. Ou seja, as doses de 12,6 e 25,1 mg/kg reduziram somente o número de chacoalhadas de cabeça ($p < 0,0001$) e o tempo do comportamento de mastigar ($p < 0,05$) em relação aos grupos controle (MIA + sem tratamento) e veículo (MIA + CMC 0,4% v.o.), diferindo estatisticamente inclusive da dose de 6,3 mg/kg nesse comportamento ($p < 0,05$) (Fig. 17B e D), mas não apresentaram diferença estatística significativa quanto aos comportamentos de coçar com a pata traseira e repousar/dormir (Fig. 17A e C). O mesmo pôde ser observado em relação à dose de 6,3 mg/kg quanto à redução no número de chacoalhadas de cabeça (Fig. 17B) em comparação com os grupos controle e veículo, porém essa dose não obteve resultado significativo em relação ao comportamento de mastigar, repousar/dormir e coçar com a pata traseira (Fig. 17D, C e A, respectivamente).

No teste de IA, as doses de 6,3; 12,6 e 25,1 mg/kg de celecoxibe (45 min pré-teste) foram capazes de aumentar significativamente o montante de ração ingerida, mas somente em relação ao grupo controle ($p < 0,05$) (Fig. 17E).

Figura 17: Efeito do celecoxibe sobre os testes de OCN e IA.

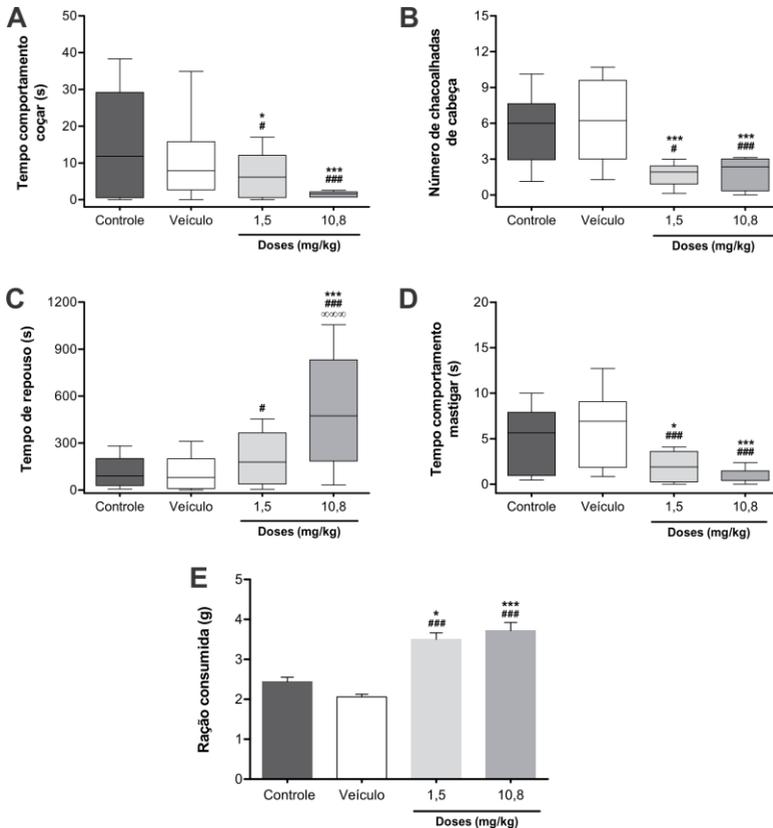


Avaliação do sétimo e oitavo dia, respectivamente, após injeção bilateral de 0,5 mg de MIA na ATM. Nos gráficos estão representados os grupos experimentais: controle (MIA + sem tratamento); veículo (MIA + CMC 0,4% v.o.); celecoxibe 6,3 (MIA + 6,3 mg/kg de celecoxibe v.o.); celecoxibe 12,6 (MIA + 12,6 mg/kg de celecoxibe v.o.) e celecoxibe 25,1 (MIA + 25,1 mg/kg de celecoxibe v.o.). As barras representam a mediana (mínimo e máximo) dos tempos e/ou número dos comportamentos de coçar com a pata traseira (A), chacoalhar de cabeça (B), repousar/dormir (C) e mastigar (D) durante 30 minutos (n=7 ou 6); e/ou média \pm E.P.M. da quantidade de ração ingerida em gramas (E) (n= 5). * indica diferença estatística em relação ao grupo controle (*p < 0,05; ***p < 0,0001); # e ∞ representam diferença estatística em relação ao grupo veículo e à dose de 6,3 mg/kg de celecoxibe, respectivamente (# e ∞ = p < 0,05; ### e $\infty\infty\infty$ = p < 0,0001). Kruskal-Wallis de uma via (ANOVA) (A, B, C e D); ANOVA de uma via seguido do teste de *post-hoc* de Tukey (E). CMC: carboximetilcelulose 0,4%.

4.3.6 AMITRIPTILINA

O antidepressivo tricíclico amitriptilina, nas doses de 1,5 e 10,8 mg/kg (i.p.), administrado 30 minutos antes do teste de OCN foi capaz de reduzir o tempo despedindo pelos animais no comportamento de coçar com a pata traseira, mastigar e o número de chacoalhadas de cabeça ($p < 0,05$) quando comparado aos grupo controle (MIA + sem tratamento) e veículo (MIA + salina) (Fig. 18A, D e B, respectivamente). No entanto, a dose de 1,5 mg/kg aumentou o tempo de repousar/dormir, mas apenas em comparação com o grupo veículo ($p = 0,027$). Já a dose de 10,8 mg/kg, além de aumentar o tempo de repousar/dormir em comparação com os grupos controle e veículo, ainda diferiu estatisticamente da dose de 1,5 mg/kg nesse comportamento ($p < 0,0001$) (Fig. 18C).

No teste de IA, a administração das doses de 1,5 e 10,8 mg/kg de amitriptilina (i.p.; 30 min pré-teste) aumentou significativamente a quantidade de ração ingerida pelos animais, em comparação com o grupo controle e grupo veículo ($p < 0,05$) (Fig. 18E).

Figura 18: Efeito da amitriptilina sobre os testes de OCN e IA.

Avaliação do sétimo e oitavo dia, respectivamente, após injeção bilateral de 0,5 mg de MIA na ATM. Nos gráficos estão representados os grupos experimentais: controle (MIA + sem tratamento); veículo (MIA + salina i.p.); amitriptilina 1,5 (MIA + 1,5 mg/kg de amitriptilina i.p.) e amitriptilina 10,8 (MIA + 10,8 mg/kg de amitriptilina i.p.). As barras representam a mediana (mínimo e máximo) dos tempos e/ou número dos comportamentos de coçar com a pata traseira (A), chacoalhar de cabeça (B), repousar/dormir (C) e mastigar (D) durante 30 minutos (n=7); e/ou média \pm E.P.M. da quantidade de ração ingerida em gramas (E) (n= 5). * indica diferença estatística em relação ao grupo controle (* $p < 0,05$; *** $p < 0,0001$); # e ∞ representam diferença estatística em relação ao grupo veículo e à dose de 1,5 mg/kg de amitriptilina i.p., respectivamente (# = $p < 0,05$; ### e $\infty\infty\infty = p < 0,0001$). Kruskal-Wallis de uma via (ANOVA) (A, B, C e D); ANOVA de uma via seguido do teste de *post-hoc* de Tukey (E).

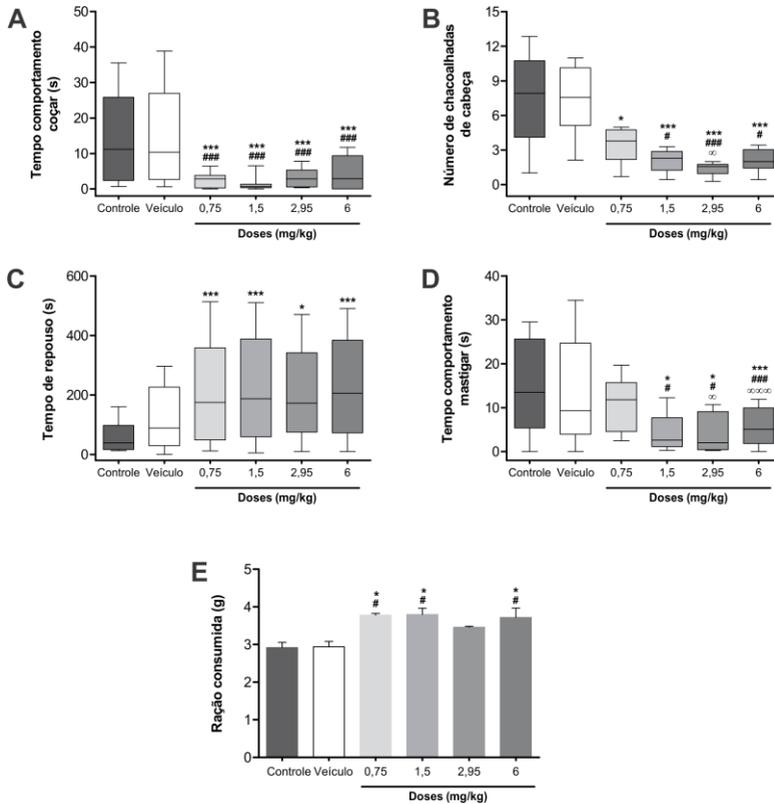
4.3.7 TRIPSINA

No teste de OCN, a administração de tripsina via oral (única administração 24 horas antes do teste), nas doses de 1,5; 2,95 e 6 mg/kg, reduziu significativamente o tempo do comportamento de coçar com a pata traseira ($p < 0,0001$), mastigar ($p < 0,05$) e o número de chacoalhadas de cabeça ($p < 0,05$) em comparação com os grupos controle (MIA + sem tratamento) e veículo (MIA + salina) (Fig. 19A, D e B, respectivamente). Já a dose de 0,75 mg/kg de tripsina, diferiu estatisticamente dos grupos controle e veículo somente no comportamento de coçar com a pata traseira ($p < 0,0001$), reduzindo o tempo deste comportamento (Fig. 19A), mas em relação ao número de chacoalhadas de cabeça, esta dose foi estatisticamente diferente somente do grupo controle (Fig. 19B) ($p = 0,001$).

Quanto ao comportamento de repousar/dormir, todas as doses aumentaram significativamente o tempo desse comportamento, mas somente em comparação com o grupo controle ($p < 0,05$) (Fig. 19C). Ainda, a dose de 2,95 mg/kg foi estatisticamente diferente da dose de 0,75 mg/kg no comportamento de chacoalhar de cabeça ($p = 0,003$) e mastigar ($p = 0,015$) (Fig. 19B e D). Da mesma forma, a dose de 6 mg/kg apresentou diferença significativa quando comparada à dose de 0,75 mg/kg no comportamento de mastigar ($p < 0,0001$) (Fig. 19D).

As doses de 0,75; 1,5 e 6 mg/kg aumentaram significativamente o montante de ração ingerido pelos animais no oitavo dia ($p < 0,05$) em relação aos grupos controle e veículo (Fig. 19E).

Figura 19: Efeito da tripsina sobre os testes de OCN e IA.



Avaliação do sétimo e oitavo dia, respectivamente, após injeção bilateral de 0,5 mg de MIA na ATM. Nos gráficos estão representados os grupos experimentais: controle (MIA + sem tratamento); veículo (MIA + salina v.o.); tripsina 0,75 (MIA + 0,75 mg/kg de tripsina v.o.); tripsina 1,5 (MIA + 1,5 mg/kg de tripsina v.o.); tripsina 2,95 (MIA + 2,95 mg/kg de tripsina v.o.) e tripsina 6 (MIA + 6 mg/kg de tripsina v.o.). As barras representam a mediana (mínimo e máximo) dos tempos e/ou número dos comportamentos de coçar com a pata traseira (A), chacoalhar de cabeça (B), repousar/dormir (C) e mastigar (D) durante 30 minutos (n=7); e/ou média \pm E.P.M. da quantidade de ração ingerida em gramas (E) (n= 5). * indica diferença estatística em relação ao grupo controle (*p < 0,05; ***p < 0,0001); # e ∞ representam diferença estatística em relação ao grupo veículo e à dose de 0,75 mg/kg de tripsina v.o., respectivamente (# e ∞ = p < 0,05; ### e $\infty\infty\infty$ = p < 0,0001). Kruskal-Wallis de uma via (ANOVA) (A, B, C e D); ANOVA de uma via seguido do teste de *post-hoc* de Tukey (E).

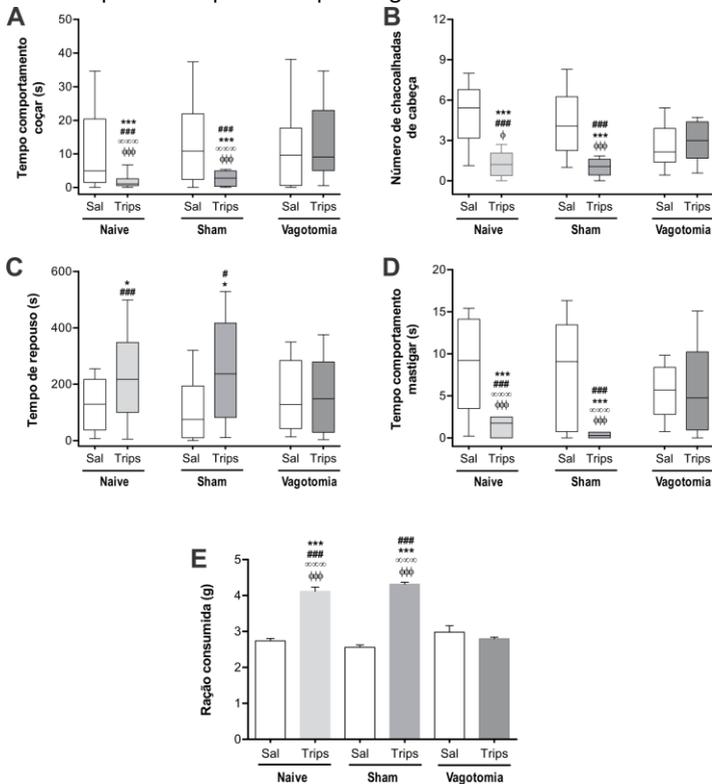
4.4 Efeito da Vagotomia Subdiafragmática sobre o tratamento com tripsina via oral

Administrada 24 horas antes do teste de OCN, a dose de 1,5 mg/kg de tripsina via oral foi capaz de diminuir significativamente o tempo despendido pelos animais nos comportamentos nociceptivos. Tanto o grupo *Naive* + tripsina, quanto o grupo *Sham* + tripsina reduziu o tempo despendido no comportamento de coçar com a pata traseira e mastigar em relação aos grupos *Naive* + salina (v.o.), *Sham* + salina (v.o.), Vagotomia + salina (v.o.) e, também, Vagotomia + tripsina ($p < 0,0001$) (Fig. 20A e D). No comportamento de chacoalhar de cabeça, os grupos *Naive* + tripsina e *Sham* + tripsina novamente reduziram o comportamento em relação aos grupos *Naive* + salina, *Sham* + salina e Vagotomia + tripsina ($p < 0,05$) (Fig. 20B).

Já o tempo de repouso mostrou aumento significativo entre os grupos *Naive* + tripsina e *Sham* + tripsina quando comparados com os grupos *Naive* + salina e *Sham* + salina ($p < 0,05$) (Fig. 20C). Contudo, o grupo Vagotomia + tripsina não foi capaz de alterar os comportamentos nociceptivos em nenhuma das situações.

No teste de IA, o perfil de resposta da tripsina manteve-se o mesmo do experimento de CDR-tripsina, ou seja, os grupos *Naive* + tripsina e *Sham* + tripsina aumentaram significativamente o montante de ração consumida quando comparado com os grupos *Naive* e *Sham* (salina) e os grupos vagotomizados ($p < 0,0001$). No entanto, o grupo Vagotomia + tripsina apresentou média semelhante ao grupo Vagotomia + salina (Fig. 20E).

Figura 20: Bloqueio da tripsina v.o. pela vagotomia nos testes de OCN e IA.



Avaliação do sétimo e oitavo dia, respectivamente, após injeção bilateral de 0,5 mg de MIA na ATM. Nos gráficos estão representados os grupos experimentais: *Naive* + salina v.o.; *Naive* + tripsina 1,5 mg/kg v.o.; *Sham* + salina v.o.; *Sham* + tripsina 1,5 mg/kg v.o.; *Vagotomia* + salina v.o. e *Vagotomia* + tripsina 1,5 mg/kg v.o. As barras representam a mediana (mínimo e máximo) dos tempos e/ou número dos comportamentos de coçar com a pata traseira (A), chacoalhar de cabeça (B), repousar/dormir (C) e mastigar (D) durante 30 minutos (n=7); e/ou média \pm E.P.M. da quantidade de ração ingerida em gramas (E) (n= 5). * indica diferença estatística em relação ao grupo *Naive* + salina (* $p < 0,05$; *** $p < 0,0001$); # e ∞ representam diferença estatística em relação ao grupo *Sham* + salina e ao grupo *Vagotomia* + salina, respectivamente (# = $p < 0,05$; ### e $\infty\infty\infty = p < 0,0001$); ϕ indica diferença estatística em relação ao grupo *Vagotomia* + tripsina ($\phi = p < 0,05$; $\phi\phi\phi = p < 0,0001$). Kruskal-Wallis de uma via (ANOVA) (A, B, C e D); ANOVA de uma via seguido do teste de *post-hoc* de Tukey (E). *Sal*: salina; *Trips*: tripsina.

Tabela 3: Sumarização de resultados

Fármaco	Tempo comportamento coçar (s)	Número de chachalhadas de cabeça	Tempo de repouso (s)	Tempo comportamento mastigar (s)	Ração consumida (g)
<i>Dexametasona</i>	+	+	+	+	-
<i>Morfina</i>	+	+	+	+	+
<i>Paracetamol</i>	+	+	+	+	-
<i>Naproxeno</i>	-	+	-	+	+
<i>Celecoxibe</i>	-	+	-	+	+
<i>Amitriptilina</i>	+	+	+	+	+
<i>Tripsina</i>	+	+	+	+	+

– Não alterou para padrões positivos o tempo ou número do comportamento e/ou quantidade de ração ingerida.

+ Alterou para padrões positivos o tempo ou número do comportamento e/ou quantidade de ração ingerida.

5 DISCUSSÃO

A OA caracteriza-se como condição de dor crônica altamente relacionada à idade e sexo, levando ao detrimento da qualidade de vida do paciente. Estudos epidemiológicos demonstram a prevalência dessa patologia em indivíduos acima de 60 anos (SHANE et al., 2010; TANAKA et al., 2008; WHO, 2003; WU; KALUNIAN, 2005), acometendo mais mulheres do que homens, em uma proporção de 2:1 (SARZI-PUTTINI et al., 2005; SCRIVANI et al., 2008). Portanto, baseando-se nos dados epidemiológicos e clínicos em relação a maior incidência da patologia osteoartrítica em mulheres, optou-se pelo uso de fêmeas nesse projeto, na tentativa de extrapolar ao máximo para a realidade da condição estudada.

A flutuação dos níveis hormonais durante o ciclo menstrual em mulheres influencia a percepção dolorosa destas (ABUBAKER et al., 1996; ABUBAKER et al., 1993; LANDI et al., 2005; LERESCHE et al., 2003). O mesmo observa-se em ratas devido à variação dos níveis de estradiol e progesterona durante o ciclo estral das mesmas, que pode modular a nocicepção, favorecendo-a ou reduzindo-a (FISCHER et al., 2008; TERNER et al., 2005; TORRES-CHÁVEZ et al., 2012). Dessa forma, os grupos foram randomizados de acordo com o fase do ciclo estral do dia do experimento. Os animais foram divididos igualmente entre os grupos para que todos tivessem o mesmo número de exemplares de cada ciclo, visando igualar qualquer alteração de nocicepção relacionada à fase do ciclo estral e seus níveis hormonais diferenciados.

O modelo de OA induzida pelo MIA está caracterizado principalmente em modelos animais de joelho (CIALDAI et al., 2013; KELLY et al., 2013; NAGASE et al., 2012; OGBONNA et al., 2013). No entanto, seu uso para indução da doença e validação desse modelo na ATM carece de mais estudos, uma vez que a maioria dos poucos estudos aborda a patologia temporomandibular induzida por MIA na ATM de coelhos (CLEDES et al., 2006; DUYGU et al., 2011; GÜLER et al., 2011). Já em ratos, apenas dois estudos relatam as alterações induzidas pelo MIA nessa articulação (WANG et al., 2012b, 2013). Dessa maneira, não há estudos farmacológicos sobre esse modelo em ATM, bem como análises sob uma perspectiva de observação comportamental nociceptiva espontânea e/ou do detrimento da funcionalidade da articulação prejudicando a ingestão de alimento.

A observação comportamental nociceptiva revela-se consistente ferramenta não invasiva para análise de quadros dolorosos agudos ou crônicos. Novamente, como dito acima, não há estudos utilizando esta abordagem para quantificação da dor em modelo de MIA na ATM de ratos. O uso de comportamentos nociceptivos ditos espontâneos como parâmetros dolorosos é descrito em outros modelos de inflamação da ATM. Roveroni e colaboradores (2001) e Arthuri e colaboradores (2005) verificaram que a injeção de formalina na articulação em questão é capaz de aumentar os comportamentos de chacoalhar de cabeça, mastigar e fricção da região orofacial (do inglês, “rubbing”) de maneira dose-dependente, atribuindo característica de marcadores de dor temporomandibular a esses comportamentos. Outros estudos com modelo de formalina na ATM de ratos corroboraram o aumento do comportamento de coçar e sustentaram esse parâmetro como comportamento espontâneo de dor (AHN et al., 2005, 2007).

Ainda, a confiabilidade desses comportamentos foi confirmada em modelo de injeção de óleo de mostarda na ATM (BONJARDIM et al., 2009; HARTWIG et al., 2003), onde o algógeno induziu aumento da ação de fricção da região temporomandibular (com a pata dianteira ou traseira) e chacoalhar de cabeça, com reversão dos mesmos através da administração de morfina. Da mesma forma, em modelos de inflamação induzida por carragenina na ATM, os comportamentos de chacoalhar de cabeça e coçar demonstraram aumento significativo após injeção do algógeno (OLIVEIRA et al., 2005; RODRIGUES et al., 2006).

Gomes e colaboradores (2009) avaliaram alterações (aumento) nos comportamentos de coçar com a pata traseira, mastigar e chacoalhar de cabeça e diminuição no tempo de repousar/dormir após injeção de CFA na ATM de ratos. Ainda, Schütz (2003) observou alterações nos padrões de sono em ratos que receberam CFA na ATM. E o mesmo foi verificado por Andersen (2000) em modelo de CFA em pata. Dessa forma, os estudos sugerem que há relação entre o comportamento de repousar/dormir e dor e que poderia ser usado como parâmetro nociceptivo espontâneo.

Segundo estudos em humanos, pacientes com DTM apresentam comprometimento da alimentação e dieta, devido ao dano articular normalmente causado pelo quadro inflamatório e doloroso das DTMs. Haketa e colaboradores (2006) avaliaram 511 pacientes apresentando

algum tipo de DTM (desarranjo de disco articular, dor miofacial e/ou artrite ou osteoartrite) quanto à dificuldade de ingestão alimentar e verificaram que pacientes com desarranjo de disco articular apresentam maior dificuldade em colocar o alimento na boca (limitação da abertura bucal), seguido pelos pacientes com osteoartrite. Além disso, os indivíduos com quadro osteoartítico ou artrítico demonstraram maior dificuldade de mordida do alimento e mastigação do mesmo (de acordo com uma escala visual analógica de dor – EVA), quando comparados aos demais grupos.

Recentemente a ingestão alimentar, bem como a duração e frequência da alimentação, tem sido abordada como teste para estudo da dor e inflamação temporomandibular em modelos animais. A injeção de CFA na ATM de ratos promove aumento na duração da ingestão (BELLINGER et al., 2007; KERINS et al., 2004, 2003; KRAMER; BELLINGER, 2013b) e redução da quantidade de ração consumida (HARPER et al., 2000; SHINODA et al., 2003; WU et al., 2010; XU et al., 2010) por esses animais. No entanto, apesar da análise da IA ser mais usada em modelos de dor temporomandibular, a injeção de CFA em joelho também promoveu redução do consumo de alimento (KERINS et al., 2005; KRAMER et al., 2010), sugerindo que padrões de ingestão não são específicos para dor orofacial.

A maioria dos modelos de dor temporomandibular utiliza dispensadores e aparatos computadorizados para medir a frequência, tamanho, quantidade e duração da ingestão alimentar (HARPER et al., 2000; KERINS et al., 2005; KRAMER et al., 2010; THUT et al., 2007). Todavia, uma abordagem diferenciada do teste, com restrição alimentar (jejum) pré-experimento, limitação do tempo para consumo (em horas) e quantidade (em gramas) pré-determinada de ração é também utilizada. Assim, Wu e colaboradores (2010) avaliaram a ingestão alimentar em modelo de CFA na ATM de ratas após um período de restrição alimentar de 15 horas e individualização dos animais em caixas, observando que o algógeno diminuiu a quantidade de ração ingerida após análise do montante total consumido pelos animais em 2 horas (somente ração, sem água). O mesmo protocolo, porém com variação no tempo de restrição alimentar (12 horas), foi utilizado por Xu e colaboradores (2010), corroborando sua eficiência como método avaliativo da redução da quantidade total de ração ingerida após injeção de CFA na ATM de ratos. Assim, o protocolo citado neste

projeto também sugere aplicabilidade e confiabilidade como teste nociceptivo não invasivo para dor temporomandibular induzida por MIA, como demonstraram os resultados dos testes de IA.

5.1 Osteoartrite induzida pelo MIA – Protocolo 1 x Protocolo2

O processo patológico da osteoartrite revela-se complexo e pouco compreendido. Assim, um modelo animal que mimetize as alterações histológicas, funcionais e sintomas (dor) da doença mostra-se necessário não só para elucidar a patologia da OA, mas também para possibilitar o desenvolvimento de novas intervenções terapêuticas ou tornar as existentes mais eficientes. Dessa forma, o modelo de OA induzida por MIA mostrou-se capaz de atender a essas premissas, levando à instalação rápida do processo de degeneração cartilaginosa e óssea e de quadros dolorosos, sustentando a cronicidade da doença no decorrer do tempo, segundo estudos em modelo de OA em joelho de ratos (BOVE et al., 2003; CIALDAI et al., 2013; NAGASE et al., 2012) e camundongos (OGBONNA et al., 2013), mas também como modelo de OA na ATM de ratos (WANG et al., 2012b, 2013).

Sabe-se que a dor é característica clínica marcante da OA e normalmente está relacionada a alterações de tecidos moles adjacentes à ATM ou, ainda, à degeneração do complexo articular (SCRIVANI et al., 2008). Dessa forma, sabendo-se que MIA induz à instalação de quadro doloroso (KALFF et al., 2010; MOON et al., 2012), e que estas alterações de limiões dolorosos são sustentadas até três semanas pós-injeção na ATM (WANG et al., 2012b), os resultados da curva dose-resposta do MIA (Protocolo 1) (Fig. 8 e 9), sustentam a eficácia da injeção desse alógeno no compartimento superior da ATM como indutor de processo patológico crônico, devido às alterações promovidas nos comportamentos nociceptivos espontâneos e sua manutenção até o 21º dia pós-injeção.

Condições inflamatórias envolvendo a ATM podem levar à sensibilização de nociceptores temporomandibulares periféricos (ALSTERGREN; KOPP, 2000), além de neurônios nociceptivos do complexo trigeminal (DUBNER; REN, 2004; IWATA et al., 1999; SESSLE, 2000), desencadeando hiperalgesia, alodinia e sensibilização central. Dessa forma, a observação comportamental nociceptiva, como descrito

anteriormente, revela-se parâmetro consistente para estudo e quantificação da dor da ATM (GOMES et al., 2009; HARTWIG et al., 2003; ROVERONI et al., 2001).

Assim, no Protocolo 1 (CDR-MIA) o teste de IA foi realizado antes do teste de OCN, o que revelou padrões de resposta diferenciados dos comportamentos analisados no teste de OCN, quando comparados com o perfil de resposta dos mesmos comportamentos no Protocolo 2 (teste de IA após teste de OCN) (Fig. 10 e 11). Ou seja, o tempo de repousar/dormir demonstrou diferença significativa do grupo salina durante todo o ciclo temporal do Protocolo 2 (Fig. 11), ao contrário do Protocolo 1, onde os tempos foram equivalentes ao grupo controle a partir do 14º dia (Fig. 9). Ainda, o comportamento de mastigar também não mostrou alteração entre os grupos MIA e controle no Protocolo 1 (Fig. 9). Contudo, no Protocolo 2 o grupo 0,5 mg de MIA apresentou diferença significativa no tempo deste comportamento quando comparado ao grupo salina (Fig. 11).

Essa diferença entre os perfis de resposta dos comportamentos nociceptivos dos dois protocolos poderia ser explicado pela possível interação entre o movimentos mandibulares de alimentação no teste de IA e ativação do sistema descendente inibitório da dor. Ou, ainda, pela integração sensorial-motora via mecanismos corticais influenciando no componente atencional da dor. Essas premissas são sustentadas pelo estudo realizado por Ogawa e colaboradores (2003), onde os pesquisadores verificaram aumento do limiar de escape para estímulo térmico em modelo de CFA em pata, bem como redução da expressão de cFos em L4-L5, após estimulação articular temporomandibular com alimento sólido. Ainda, os autores sugeriram envolvimento do sistema sensorial trigeminal, do sistema opioide (após reversão das repostas pela naloxona) e do córtex somatossensorial (por lesão cortical bilateral) como facilitadores do sistema inibitório descendente, resultando no efeito antinociceptivo desencadeado pelos movimentos mandibulares do processo de alimentação.

Ainda, sabe-se que aferentes nociceptivos primários da ATM projetam-se em sua maioria para o Sp5C do nervo trigêmeo e que este subnúcleo possui conexões de segunda ordem com outros núcleos que compõe o sistema descendente inibitório da dor, como: PAG, RVM, NTS, LC, CLVM, PBN e NRV (TAVARES et al., 1996; TAVARES; LIMA, 1994, 2002; YAMAZAKI et al., 2008), como revelaram estudos de

traçado neuronal e estimulação elétrica de subnúcleos do trigêmeo (CAOUS; DE SOUSA BUCK; LINDSEY, 2001; YAMAZAKI et al., 2008). Assim, essas conexões poderiam apoiar o pressuposto de que este sistema possa ser ativado pelos movimentos mandibulares no teste de ingesta alimentar e desencadear antinocicepção, modulando os comportamentos de repousar/dormir (a partir do 14º dia) e mastigar do Protocolo 1.

Ainda sobre o comportamento de mastigar, em modelo de formalina na ATM, este não diferiu do grupo salina entre o terceiro e o sexto dia (ROVERONI et al., 2001). Contudo, em avaliação sobre modelo de CFA na ATM, Gomes e colaboradores (2009) verificaram que o comportamento de mastigar difere significativamente do grupo salina no mesmo período de tempo. Assim, o mesmo pôde ser observado no 3º e 7º dias referentes ao Protocolo 2 deste projeto, em que o comportamento de mastigar teve aumento significativo quando comparado ao grupo controle (Fig. 11).

Processos inflamatórios podem ser gerados por injúria local na ATM (CAIRNS, 2010), logo a introdução da agulha na cápsula articular e músculos adjacentes e/ou talvez o volume injetado na articulação, além do próprio algógeno (HARTWIG et al., 2003; ROVERONI et al., 2001) poderiam levar à ativação de mecanismos periféricos e promover infiltração inflamatória. Além da liberação de outros mediadores que promoveriam a instalação do quadro e sensibilização de nociceptores periféricos (TANAKA et al., 2008). Isso poderia explicar o aumento do comportamento de mastigar não só no grupo MIA, mas também no salina e sua diminuição drástica e/ou resolução, respectivamente, após o 7º dia tanto no Protocolo 1 quanto no 2 (Fig. 9 e 11, respectivamente). Assim, sugere-se que o comportamento de mastigar representaria desfecho de quadro inflamatório inicial agudo.

A cronicidade da dor tem sido relacionada com alterações e distúrbios do sono, tanto em pacientes com OA (HAWKER et al., 2008; LEIGH et al., 1988), quanto em modelos animais (GOMES et al., 2009; ANDERSEN; TUFIK, 2000; SCHÜTZ et al., 2003; SILVA et al., 2011). Dessa maneira, os resultados dos padrões de tempo de repousar/dormir significativamente reduzidos tanto no Protocolo 1 (Fig. 9) quanto no 2 (Fig. 11) em relação ao grupo controle, porém sustentado até o 21º dia somente nesse segundo protocolo, possibilitam sugerir relação entre sono/repouso e dor, semelhante aos resultados de Silva e

colaboradores (2008) que avaliaram os padrões de sono e dor de ratos com OA induzida por MIA em joelho durante 28 dias. Os pesquisadores constataram diminuição do limiar doloroso e redução da eficiência e tempo de sono, o qual diferiu já na primeira semana pós-injeção e se sustentou até o último dia do protocolo. Ainda, o mesmo grupo de pesquisadores mostrou que essas alterações nos padrões de sono são comuns em ambos os sexos, porém mais pronunciadas em machos quando em comparação com fêmeas, interferindo, inclusive, nos níveis hormonais de testosterona (SILVA et al., 2011).

Evidências sugerem que a atividade persistente de nociceptores pode levar à sensibilização central e que esta compõe a grande maioria das características clínicas de patologias crônicas (SESSLE, 2000). O mesmo observa-se na ATM, resultando, até mesmo, em comorbidades associadas à DTM em humanos (CAIRNS, 2010; SHAEFER et al., 2013; YOUNGER et al., 2010) e em ratos (CADY et al., 2011). A sensibilização tanto periférica quanto central é representada por elevação dos padrões de excitabilidade da membrana neuronal. Na periferia, essa sensibilização deve-se, principalmente, à liberação de mediadores inflamatórios locais. E a excitabilidade neuronal central mostra-se dependente, basicamente, da liberação de aminoácidos excitatórios e neuropeptídeos em termos de complexo trigeminal e estruturas associadas (CADY et al., 2011). Dessa forma, a sensibilização central pode resultar da estimulação crônica de nociceptores e, conseqüentemente, da modificação de neurônios centrais relacionados com a transmissão dolorosa (HOCHMAN et al., 2010). Ainda, alguns dos sintomas relatados por pacientes com dor neuropática (sensibilização central) é coceira e sensação semelhante à choque elétrico na região afetada (GILRON et al., 2006).

Assim, levando-se em consideração os expostos do parágrafo acima, e verificando os resultados dos comportamentos de coçar com a pata traseira e chacoalhar de cabeça que se mantiveram elevados até o último dia do Protocolo 1 e 2 (Fig. 8 e 10, respectivamente), sugere-se que estes comportamentos poderiam estar relacionados a alterações no SNC desencadeadas pela sensibilização central, refletindo características de quadro crônico osteoartítico.

A limitação de abertura bucal, bem como de movimentos mandibulares desencadeando dor (ALSTERGREN; KOPP, 1997; GUARDA-NARDINI et al., 2012; HAKETA et al., 2006; LEE et al., 2012),

levando à dificuldade de alimentação (HAKETA et al., 2006), tem sido relatado por pacientes com OA temporomandibular como sintoma da patologia. Dessa forma, outro possível marcador da cronicidade do modelo de MIA neste estudo poderia ser atribuído ao teste de IA. Os resultados, tanto no Protocolo 1 (Fig. 7) quanto no 2 (Fig. 12), demonstram redução significativa na quantidade de alimento ingerido pelos animais do grupo MIA em relação ao animais controle. Essa diminuição é sustentada durante todo o protocolo experimental, porém não há trabalhos relacionando a ingesta alimentar e o modelo de OA induzido por MIA na ATM. Assim, pode-se estabelecer relação com resultados encontrados em modelos de artrite induzida por CFA na ATM de ratos, onde a ingesta alimentar foi significativamente reduzida devido ao comprometimento articular desencadeado pelo alógeno (HARPER et al., 2000; WU et al., 2010; XU et al., 2010). Shinoda e colaboradores (2003) constataram redução não só na quantidade de ração ingerida, mas também no consumo de água e peso dos animais a partir do 6º dia, mantendo-se até o final do protocolo de 30 dias.

5.2 Testes farmacológicos – Protocolo 3: CDR-fármacos

Sabe-se que o tratamento farmacológico proposto para osteoartrite temporomandibular apresenta característica paliativa, ou seja, busca-se o conforto do paciente na resolução dos quadros dolorosos, mas ainda não há fármacos que possibilitem a paralização ou remissão da doença (drogas modificadoras da doença) (COMBE et al., 2004; HERSH et al., 2008; MACHON et al., 2011). Alguns protocolos farmacológicos para tratamento de OA indicam o uso desde analgésicos e AINES até fármacos de ação central, devido a cronicidade e abrangência da patologia no que tange o SNC (BOBACZ, 2013).

Como não há relatos de estudos farmacológicos envolvendo o modelo de OA induzida por MIA na ATM, buscou-se avaliar a eficácia das doses terapêuticas dos fármacos mais utilizados na clínica médica para tratamento da OA temporomandibular. Para isso, realizou-se curvas dose-resposta das principais doses terapêuticas de acordo com a transformação de proporcionalidade de doses para ratos fornecida pelo cálculo alométrico (PACHALY, 2006). Com exceção das doses de

dexametasona e morfina, todos os outros fármacos sofreram tal transformação. Optou-se, então, por basear as doses de dexametasona (BOLETA-CERANTO et al., 2005) e morfina (PELISSIER et al., 2002) em trabalhos de abordagens semelhantes em relação à manipulação de patologias da ATM, pois as doses desses fármacos apresentam faixa terapêutica expressivamente variável, o que dificultaria a escolha correta de doses, bem como poderia ser fator predisponente para algum viés de seleção e/ou aferição.

Dessa forma, os resultados do efeito da administração de dexametasona (Fig. 13) revelaram redução dos comportamentos nociceptivos espontâneos no teste de OCN, com a menor dose (2,5 mg) respondendo positivamente para a maioria dos comportamentos (com exceção do comportamento de repousar/dormir que foi revertido a partir da segunda menor dose: 4,6 mg). Tais resultados são condizentes com a ação anti-inflamatória da dexametasona observada em modelos de patologias degenerativas da ATM de ratos no controle do edema, dor (KERINS et al., 2005), infiltrado inflamatório (EL-HAKIM et al., 2005), em modelo de OA de joelho em coelhos (HUEBNER et al., 2014) e na redução da dor em modelo de CFA em joelho de ratos (MATSON et al., 2007). O processo envolvido provavelmente inclui a inibição não só da via cicloxigenase e da transcrição de citocinas importantes no quadro OA, como, por exemplo, a já citada IL-1 β (ALSTERGREN et al., 1996), mas também outros mecanismos (como ação sobre células pró-inflamatórias, entre outros), promovendo alívio do quadro doloroso pela modulação do quadro inflamatório.

Ainda, no teste de IA (Fig. 13E) nenhuma das doses de dexametasona foi capaz de aumentar a quantidade de ração ingerida. Sabe-se que a administração de corticosteroides tem como efeito secundário o aumento dos níveis de glicose sanguínea (redução da captação e utilização de glicose e aumento da glicogênese). Esse aumento do volume e captação de glicose em áreas hipotalâmicas poderia produzir sensação de saciedade (BERNARDIS; BELLINGER, 1996). Assim, sugere-se que esse efeito da dexametasona sobre o metabolismo da glicose poderia explicar a menor ingestão de alimento como observado no teste. Além disso, esse resultado assemelha-se ao encontrado por Kerins e col. (2005) onde a dexametasona também manteve baixo os padrões de ingestão alimentar em modelo de CFA na ATM de ratos.

Sendo assim, o uso de corticosteroides constitui opção de tratamento farmacológico para pacientes com DTM, principalmente nos casos de artrite e osteoartrite. A dexametasona, um potente corticosteroide com ação anti-inflamatória comprovada, apresenta afinidade para receptores glicocorticoides intracelulares. Os corticosteroides aumentam a transcrição de citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e IL-1Ra: antagonista de receptor para IL-1) e reduzem a transcrição de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, TNF- α) e modulam indiretamente a inibição da fosfolipase A₂, contribuindo para o alívio da dor e melhoramento da funcionalidade articular em pacientes com OA (BRATTSAND; LINDEN, 1996; JOYCE et al., 1996). Além disso, Alstergren e col. (1996) verificaram que a injeção intra-articular de glicocorticoide é capaz, também, de reduzir os níveis de NPY no fluido sinovial, aumentando o limiar doloroso e diminuindo a dor em movimentos mandibulares em humanos.

O ácido araquidônico derivado da membrana celular pode ser liberado após injúria tecidual. Uma cascata de eventos é então acionada e se dá início à produção de diferentes prostanoídes através da interação com enzimas cicloxigenases (SWIFT et al., 1998b). Três isoformas da enzima cicloxigenase foram identificadas: COX-1 (presente em muitos tecidos de forma constitutiva e participante de processos de homeostasia, proteção gástrica e função renal); COX-2 (presente em alguns tecidos na forma constitutiva, porém expressa de maneira mais vigorosa na presença de injúrias, como indutiva); e a COX-3 (presente no SNC e coração) (MARTEL-PELLETIER et al., 2003).

A PGE₂, um dos principais produtos dessa cascata, apresenta importantes efeitos pró-inflamatórios, auxiliando no aumento da permeabilidade vascular, liberação de SP por fibras sensoriais (NICOL et al., 1992), ativação de canais de cálcio e, ainda, facilitando a ação excitatória da bradicinina em neurônios nociceptores (NEUGEBAUER et al., 1989). PGE₂ e leucotrieno B₄ foram isolados no fluido sinovial da ATM de pacientes com artralgia. Ainda, coloração imuno-histoquímica para COX-2 foi detectada em vasos sanguíneos sinoviais, células de revestimento e células do tipo fibroblasto em diferentes tipos de artrite e OA (SIEGLE et al., 1998). Além disso, estudos demonstram que a cartilagem osteoartítica libera espontaneamente PGE₂ até 50 vezes mais do que uma cartilagem normal, e até 18 vezes mais do que uma cartilagem estimulada com citocinas e endotoxinas e essa

superprodução de PGE_2 coincide com a regulação positiva (do inglês, “upregulation”) de COX-2 em cartilagens afetadas pela OA (AMIN et al., 1997).

Da mesma forma, estudos demonstram que condrócitos de articulações humanas não expressam mRNA para COX-2 de forma detectável, porém este é induzido por citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-17) e TNF- α (BLANCO et al., 1999). Takahashi e col. (1998) avaliaram amostras de fluido sinovial de pacientes com DTM e constataram presença elevada de níveis de IL-1 β , IFN- γ , IL-6, IL-8 e TNF- α (KANEYAMA et al., 2005b; KUBOTA et al., 1998). Enquanto que essas citocinas não foram detectadas no fluido sinovial de pacientes saudáveis, sugerindo relação entre IL-1 β e dor, e citocinas no desenvolvimento da patologia degenerativa da cartilagem e osso subcondral da ATM, ou seja, participando no desenvolvimento da OA. Vernal e col. (2008) sugerem, ainda, que as IL-10, IL-12 e IL-17 também estão envolvidas na patogenia da OA temporomandibular após análise dos níveis de citocinas do fluido sinovial de pacientes com OA na ATM. Essas citocinas também foram mensuradas em modelos de artrite temporomandibular em camundongos (NEDAJ et al., 2011) e em modelo de MIA em joelho de ratos (DAWES et al., 2013).

Ainda, estudos relatam a presença do neuropeptídeo NPY no fluido sinovial de pacientes com degeneração temporomandibular, relacionando-o à dor em repouso. A 5-HT também está presente na articulação de pacientes com dor ao movimento mandibular (KOPP, 1998). A IL-1 β , produzida por uma variedade de células incluindo monócitos, condrócitos e macrófagos sinoviais (TOCCI, 1997), está fortemente relacionada com o desenvolvimento de hiperalgesia na ATM, devido à sensibilização de nociceptores em estados crônicos (WATKINS et al., 1994), além de também estar relacionada com dor em repouso e à degeneração articular como sinal radiográfico da doença (KOPP, 1998) através da ativação de metaloproteinases (MMPs), principalmente ativação de MMP3 (GARNERO et al., 2005; HUEBNER et al., 2014). NPY e IL-1 β , ainda, são relacionados com a condição de mordida aberta anterior como sinal clínico do comprometimento articular observado em DTMs (NORDAHL et al., 1997).

Os opioides também compõe a terapia farmacológica das DTMs e seu uso é indicado para dores não-cancerosas em estados em que o paciente não responde às primeiras abordagens com AINES e

analgésicos (OKESON; DE LEEUW, 2011). A morfina, um agonista de receptores opioides MOP (μ), é um analgésico de ação central e tem sido usada para discriminar comportamentos nociceptivos espontâneos em modelos de dor. Sua ação em DTMs está relacionada com redução da liberação de SP na medula e ativação das vias descendentes analgésicas opioidérgicas (HERSH et al., 2008) e sensibilização de terminais periféricos mielinizados e não-mielinizados através de receptores opioides periféricos presentes em tais fibras (COGGESHALL; CARLTON, 1997).

A administração de morfina sistêmica alterou para padrões positivos os comportamentos nociceptivos analisados (Fig. 14), sendo que a menor dose responsiva e eficaz em todas os parâmetros analisados foi a dose de 2 mg/kg. Entretanto, observou-se exceção do comportamento de repousar/dormir, onde somente a dose de 4 mg/kg apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle. Esse efeito sugere que as doses testadas não desencadearam o efeito sedativo comum a doses mais elevadas de opioides (POMONIS et al., 2005) e que o comportamento de repousar/dormir poderia não ser dependente, na sua totalidade, do sistema opioide. Esse resultado assemelha-se ao encontrado por Gomes e col. (2009).

Em modelo de formalina na ATM de ratos, a morfina foi capaz de reverter os comportamentos nociceptivos espontâneos, como chacoalhar de cabeça, mastigar, repousar/dormir e coçar com a pata traseira (GOMES et al., 2009; ROVERONI et al., 2001), além de atenuar a expressão de cFos no subnúcleo caudal do trigêmeo (HARTWIG et al., 2003). O mesmo padrão analgésico da morfina para os comportamentos nociceptivos em questão foi encontrado no modelo de óleo de mostarda na ATM de ratos (BONJARDIM et al., 2009). Outro estudo, utilizando esse mesmo modelo, verificou que a administração tanto central quanto sistêmica de morfina foi capaz de reduzir a expressão de cFos no subnúcleo caudal (Sp5C), na região paratrigeminal dorsal (dPa5) e no subnúcleo interpolar (Sp5I) do gânglio trigêmeo, sugerindo relação entre sistema opioide e modulação sensorial e/ou reflexa após injúria da ATM (BEREITER; BENETTI, 2006).

Em relação ao teste de IA, todas as doses testadas aumentaram de maneira expressiva e significativa o montante de alimento ingerido (Fig. 14E). Este aumento expressivo pode estar relacionado com receptores opioides e sua ativação pela morfina no núcleo *accumbens*,

pois este núcleo, juntamente com o núcleo pálido ventral, faz parte do circuito neuronal responsável pela sensação de “gostar” do alimento. A injeção de agonista opioide (DAMGO) no núcleo *accumbens* desencadeia fome dita voraz, especialmente de alimentos com alto teor de açúcar e gordura. Esta ação é revertida após administração de antagonista opioide seletivo para receptores mu, onde a ingestão é diminuída (BERRIDGE; ROBINSON, 2003; DAMIANI; DAMIANI, 2011; PECIÑA; BERRIDGE, 2000).

No presente trabalho, a menor dose de paracetamol (30 mg/kg) reverteu os comportamentos nociceptivos espontâneos analisados (Fig. 15). Contudo, a maior dose não foi capaz de reverter todos os comportamentos analisados. O pico plasmático do paracetamol é entre 30 e 60 minutos após administração (GOODMAN; GILMAN, 2010) e os animais receberam a droga 30 minutos antes do teste, sendo assim, sugere-se que a maior dose do fármaco necessitaria de maior tempo para efetiva absorção e disponibilização no sistema. O grupo paracetamol não apresentou consumo de ração estatisticamente significativo quando comparado ao grupo controle e veículo (Fig. 15E). Esse resultado assemelha-se ao estudo de Venkatesan e col. (2014) que avaliaram a toxicidade subaguda do paracetamol em ratos nas doses de 250 a 1000 mg/kg e verificaram que nenhuma das doses foi capaz de alterar o ganho de peso e o consumo total diário de ração, quando comparado ao grupo controle, em nenhum dos dias avaliados (dias 8, 15, 22 e 28).

O paracetamol é classificado como um AINE apesar de apresentar fraca propriedade anti-inflamatória, mas com potente ação antipirética e analgésica e com menor incidência de efeitos colaterais. Utilizado como um dos fármacos de primeira escolha no tratamento da OA de joelho e quadril, comumente associado com AINES ou opioides fracos (STAM et al., 2012; TOWHEED et al., 2006). Seu mecanismo de ação ainda é incerto, mas se sabe que este fármaco produz seu efeito antinociceptivo por vias diferentes das vias COX-1 e COX-2. Em modelos de formalina na pata (HUNSKAAR; HOLE, 1987) e em modelo de dor orofacial (MIRANDA; SIERRALTA; PRIETO, 2009) em camundongos, o paracetamol reduziu comportamento nociceptivo em ambas as fases do alógeno. Em modelo de MIA em joelho, o paracetamol também revelou perfil analgésico, revertendo o comportamento espontâneo de sustentação de peso na pata traseira

(BOVE et al., 2003) e número de “rears” em fase tardia do modelo (NAGASE et al., 2012) para padrões positivos.

Ainda, corroborando a ação do paracetamol em modelos envolvendo ATM, Ahn e col. (2005) verificaram eficácia analgésica do fármaco na redução do comportamento de coçar desencadeado por hiperalgesia induzida por IL-1 β em modelo de formalina na ATM. O mesmo grupo de pesquisadores, em 2007, verificou aumento da analgesia (redução do comportamento de coçar em modelo de formalina na ATM) desencadeado por agonista canabinoide após associação com paracetamol e outros AINES. Em humanos, estudos clínicos demonstram eficácia do paracetamol no controle da dor em pacientes com OA de joelho e quadril (STAM et al., 2012; TOWHEED et al., 2006; ZHANG et al., 2004), além de melhorar a função articular (SHEN et al., 2006), atribuindo, também, um melhor perfil de segurança em comparação com outros AINES.

Os resultados do teste de OCN (Fig. 16 e 17) revelaram o mesmo padrão de respostas para os dois anti-inflamatórios testados (naproxeno e celecoxibe), ou seja, ambos foram eficazes em reduzir os comportamentos de chacoalhar de cabeça e mastigar, contudo não diminuíram os comportamentos de coçar com a pata traseira e/ou aumentaram o tempo de repouso. Semelhante ao trabalho de Ahn e col. (2007), onde a administração isolada de inibidores da COX (NS-398, seletivo para COX-2; e indometacina, não-seletivo) não promoveu redução do comportamento de coçar em modelo de formalina na ATM de ratos (AHN et al., 2005), a redução do comportamento pelos AINES somente foi possível quando associados ao agonista canabinoide WIN 53,212-2. Ainda, Nagase e col. (2012) verificaram eficácia do naproxeno e celecoxibe na redução do comportamento espontâneo de dor em modelo de MIA em joelho. Contudo essa redução foi presente somente no 3º dia após injeção do algógeno, não apresentando resultado na análise do 28º dia, sustentando a presença de quadro inflamatório dependente de PGs na fase inicial do modelo. Naproxeno e celecoxibe também foram eficazes na reversão de assimetria de sustentação de peso em modelo de MIA em joelho (BOVE et al., 2003; IVANAVICIUS et al., 2007; RASHID et al., 2013).

O uso de AINES no tratamento de artrites e osteoartrites está bem estabelecido. Recentemente o uso de inibidores seletivos da COX-2 passou a compor esse grupo de fármacos, principalmente pela

diminuição das lesões gástricas comuns aos AINES não-seletivos (DIONNE, 1997; GOLDENBERG, 1999; HERSH et al., 2008; TA; DIONNE, 2004). O naproxeno, inibidor não-seletivo da cicloxigenase, derivado do ácido propiônico, atua na cascata do ácido araquidônico inibindo a produção de PGs (BOVE et al., 2003). Celecoxibe, por sua vez, inibe apenas a COX-2 e seu efeito parece não diferir dos AINES não-seletivos em pacientes com DTM (DEEKS et al., 2002). Contudo, seu uso crônico está relacionado a aumento de riscos cardiovasculares (SOLOMON et al., 2005).

Sobre a diferença estatística encontrada entre o grupo veículo (CMC+Tw80) e o grupo MIA (controle) no comportamento de mastigar do teste de OCN envolvendo o anti-inflamatório naproxeno (Fig. 16D), sugere-se que o veículo tenha desencadeado uma reação anti-inflamatória, em menor grau, possivelmente sustentada pela ativação vagal. Como é sabido, a ativação do nervo vago por mediadores inflamatórios liberados por células imunes frente a patógenos viscerais revela-se mecanismo de neurotransmissão para respostas imunes relacionadas ao nervo em questão e o sistema gastrointestinal (GOEHLER et al., 2000; VAN et al., 2009). Além disso, sabe-se que sua ativação pode levar a episódios antinociceptivos e anti-inflamatórios em modelos animais (BOHOTIN et al., 2003; BOSSUT; MAIXNER, 1996; TAKEDA et al., 2002; TANIMOTO et al., 2002).

Dessa forma, o comportamento de mastigar revelou-se sensível a todos os fármacos e parece independer da ativação de mecanorreceptores, o que o diferenciaria do movimento de mastigar/roer comum à ingesta alimentar que apresenta carga mecânica expressiva sobre o complexo articular e, por isso, pode desencadear hiperalgesia mecânica (KRAMER et al., 2010). Assim, o comportamento de mastigar do teste de OCN poderia responder a graus de ativação de menor escala referentes aos padrões antinociceptivos desencadeados pela ativação do nervo vago e consequente ativação da via descendente inibitória. Possivelmente, isso proporcionaria uma redução do tempo de mastigar pelo veículo CMC+Tw80. Contudo, essa possível resposta antinociceptiva desencadeada pela ativação do complexo vagal não seria em grau elevado o suficiente para promover reversão dos demais comportamentos.

Essa premissa é sustentada por estudo publicado na revista *Nature* em 2015, onde Chassaing e col. (2015) avaliaram a influência dos emulsificantes carboximetilcelulose (CMC) e polissorbato 80 (Tween 80® – nome comercial), comuns em alguns alimentos, em promover aumento da síndrome do intestino irritável. Utilizando-se de camundongos, os pesquisadores verificaram que concentrações baixas dos dois emulsificantes induziram inflamação de baixo-grau, além de promoverem episódio de colite. Essa ação foi atribuída à facilitação promovida pelos dois compostos na ruptura da mucosa de proteção intestinal favorecendo, assim, o contato da microbiota do meio com células epiteliais e promovendo o processo inflamatório.

Sabe-se que os níveis de PGs elevam-se rapidamente após injeção do MIA e que retornam ao valores basais no 7º dia após sua injeção (PULICHINO et al., 2006). Além disso, estudos histológicos confirmam a diminuição com quase resolução total do quadro inflamatório representado pelo infiltrado de células inflamatórias na membrana sinovial de articulações manipuladas pela injeção do MIA, e que a partir do 14º esse infiltrado é praticamente inexistente (BOVE et al., 2003; VAN DER KRAAN et al., 1989). Dessa forma, sugere-se que possa haver outros mediadores inflamatórios (como IL-1 β , TNF- α , radicais livres, etc.) mediando os comportamentos de coçar com a pata traseira e repousar/dormir, uma vez que a administração de dexametasona conseguiu reverter esses comportamentos ou, ainda, como sugerido por Gomes e col. (2009), que possa haver algum componente central envolvido no comportamento de coçar com a pata traseira. Além disso, o comportamento de chacoalhar de cabeça reduzido pelo naproxeno e celecoxibe, presente durante os vinte e um dias do protocolo de MIA na ATM, pode apresentar, talvez, participação de PGI₂, relacionada com o desenvolvimento de inflamações crônicas (PULICHINO et al., 2006).

Ainda, tanto naproxeno quanto celecoxibe aumentaram a quantidade de ração ingerida pelos animais em comparação com o grupo MIA (Fig. 16E e 17E). Essa alteração positiva nos padrões de ingesta alimentar também foi observado em modelo de CFA na ATM de ratos, tanto para AINE não-seletivo (ibuprofeno) (KERINS et al., 2003), quanto para inibidor de COX-2 (rofecoxibe) (KERINS et al., 2004) e atribuído ao seu efeito anti-inflamatório e consequente controle da hiperalgesia do complexo mastigatório.

Antidepressivos em doses menores também têm sido usados para tratamento de dor crônica de DTMs (PLESH et al., 2000; RIZZATTI-BARBOSA et al., 2003). Seu mecanismo de ação e eficácia está baseado em sua ação sobre o sistema monoaminérgico, no aumento da concentração de 5-HT e NA (pelo bloqueio da recaptação dessas monoaminas) no SNC e periféricamente, além da facilitação da via descendente inibitória da dor (MICÓ et al., 2006). Centralmente os antidepressivos parecem interagir com o sistema opioide endógeno e seus receptores; com receptores histamínicos, muscarínicos, nicotínicos e serotoninérgicos de forma inibitória (FRYER; LUKAS, 1999; HALL; OGREN, 1981); na modulação de receptores NMDA (reduz o acúmulo intracelular de Ca^{2+} induzido pelo NMDA) (CAI; MCCASLIN, 1992). Já periféricamente, os antidepressivos exercem sua função analgésica pelo aumento da viabilidade de NA e 5-HT nos terminais nervosos periféricos, principalmente (SAWYNOK et al., 2001).

A amitriptilina, um antidepressivo tricíclico, tem sido estudada quanto ao seu potencial analgésico em diversos modelos animais (FUCHS et al., 1996). Ivanavicius e col. (2007) verificaram que doses de 3 a 30 mg de amitriptilina foram eficazes em alterar assimetria de sustentação de peso desencadeada pela injeção de MIA no joelho de ratos na fase tardia do modelo (após 14^o dia). Ainda, a administração local de amitriptilina (s.c.) em modelo de formalina em pata reverteu comportamentos nociceptivos espontâneos de chacoalhar e morder/lamber, e a administração de cafeína reverteu parcialmente esse efeito antinociceptivo do antidepressivo, sugerindo a modulação de receptores de adenosina (A_1) em terminais nervosos sensoriais pela amitriptilina (SAWYNOK et al., 1999). Antidepressivos tricíclicos (incluindo amitriptilina) foram testados quanto a sua possível interação com a liberação, captação e recaptação de 5-HT liberada pelos mastócitos *in vitro*. Verificou-se que altas concentrações desses fármacos inibem a liberação de serotonina das células em questão, já concentrações menores inibem a captação da monoamina, demonstrando outro possível mecanismo de ação periférico do fármaco (FERJAN; LIPNIK-ŠTANGELJ, 2013).

Os resultados apresentados nesse projeto, em relação à amitriptilina nos testes de OCN (Fig. 18), sugerem efeito antinociceptivo do fármaco. Ambas as doses testadas (1,5 e 10,8 mg/kg) alteraram os comportamentos nociceptivos espontâneos para

padrões positivos quando comparadas com o grupo controle e veículo. A diferença expressiva da maior dose do antidepressivo no tempo de repousar/dormir, poderia ser atribuída a um possível efeito sedativo dessa dose. Sugere-se, também, que possa haver característica neuropática nos comportamentos de repousar/dormir e chacoalhar de cabeça e, de maneira mais expressiva, em relação ao comportamento de coçar com a pata traseira que foi não responsivo aos AINES (assim como o comportamento de repousar/dormir), além de serem expressos até o final do protocolo de 21 dias.

A amitriptilina também elevou, de maneira expressiva, a quantidade de ração ingerida pelos animais no teste de IA em ambas as doses testadas (Fig. 18E). Além do perfil analgésico da droga, outro fator que poderia contribuir para esse aumento observado seria sua ação inibitória sobre receptores histaminérgicos (H_1) no hipotálamo ventromedial (VHM) e/ou no núcleo paraventricular (PVN), como observado por Ookuma e col. (1990). Após injeção de antidepressivos, dentre eles a amitriptilina, nos núcleos citados, a amitriptilina aumentou e apresentou os maiores padrões quanto à frequência, duração e latência de ingesta, confirmando a ação em receptores H_1 pelo uso de antagonistas desse receptor e pela comparação dos sítios de ação dos antidepressivos e agonistas H_1 no hipotálamo.

Ainda, avaliou-se o papel da tripsina como analgésico no presente trabalho, a fim de explorar a ação dessa protease em modelo de OA. A maioria dos estudos envolvendo tripsina relatam sua possível ação através de receptores PAR, contudo essa associação está normalmente relacionada ao desenvolvimento de eventos inflamatórios e nociceptivos (FERRELL et al., 2003; KELSO et al., 2006; MEYER-HOFFERT et al., 2004). Por exemplo, a ativação de receptores PAR-2, presentes na ATM, pela tripsina promove efeito pró-inflamatório (DENADAI-SOUZA et al., 2010). Sabe-se que a tripsina, protease produzida por células acinares do pâncreas, ativa receptores PAR-2 (revela-se agonista mais potente para tal receptor) e PAR-4 e, com doses maiores da protease, ativa também receptores PAR-1 (DÉRY et al., 1998; MEYER-HOFFERT et al., 2004; MIKE et al., 2001). Encontrados no TGI tanto de humanos quanto de ratos, os receptores PAR-2 (MACFARLANE et al., 2001; VERGNOLLE et al., 2001b) parecem desempenhar função de mediadores da nocicepção (liberação de SP e CGRP em terminações nervosas sensoriais) e, ainda, algum efeito

protetivo da mucosa no TGI (KNECHT et al., 2007; OSSOVSKAYA; BUNNETT, 2004). Sabe-se que esses receptores encontram-se nos terminais periféricos de aferentes mesentéricos e mioentéricos no TGI, sugerindo relação com aferentes do nervo vago (KONG et al., 1997).

Os experimentos envolvendo administração oral da tripsina demonstraram efeito analgésico positivo no teste de OCN (Fig. 19). A menor dose responsiva para todos os comportamentos foi a de 1,5 mg/kg. A tripsina foi administrada 24 horas antes do experimento baseado no trabalho de Sant'ana (2013), onde se verificou que uma única administração de tripsina via oral foi capaz de sustentar o efeito antinociceptivo em teste de incapacitação articular e de controlar o edema articular durante 7 dias em modelo de artrite induzida por CFA em joelho. Dessa forma, uma relação poderia ser estabelecida entre o trabalho citado e o presente projeto, pois além do efeito antinociceptivo apresentado pela tripsina no teste de OCN, esse efeito perdurou, pelo menos, até o oitavo dia (48 horas após a administração), quando ocorreu o teste de IA, revelando efeitos positivos nos padrões analisados. A tripsina foi capaz de elevar o montante de ração ingerida pelos animais (Fig. 19E), supostamente devido à sua ação antinociceptiva e anti-inflamatória, possibilitando redução do quadro hiperalgésico desencadeado pela ingesta e consequente aumento da quantidade de ração ingerida.

5.3 Efeito da Vagotomia Subdiafragmática sobre o tratamento com tripsina via oral

Para verificar a possível relação entre a ação da tripsina e ativação do nervo vago, procedeu-se o procedimento de vagotomia subdiafragmática. A secção das porções subdiafragmáticas do nervo vago revelaram inibição da ação da tripsina, pois os animais vagotomizados que receberam tripsina via oral não exibiram diferença nos comportamentos nociceptivos do teste de OCN em comparação com o grupo controle que recebeu salina. Os animais dos grupos *Naive* e *Sham* que receberam tripsina demonstraram os mesmos padrões positivos na reversão dos comportamentos analisados, sugerindo uma consistente relação entre tripsina e nervo vago (Fig. 20). O teste de IA corrobora com o pressuposto, pois os grupos vagotomizados não

apresentaram diferença na quantidade de ração ingerida (Fig. 20E), situação essa revertida pela tripsina nos grupos sham e naive. Novamente, dá-se como comparação os resultados encontrados por Sant'ana (2013) que teve os efeitos antinociceptivos e anti-inflamatórios da tripsina abolidos após vagotomia subdiafragmática.

Sabe-se que o nervo vago está relacionado com transmissão nociceptiva gastrointestinal e com respostas imunes desse sistema. Uma vez que a sensibilização de aferentes vagais por mediadores inflamatórios liberados após sensibilização de células imunes por patógenos promove ativação de neurônios de segunda ordem no NTS (GOEHLER et al., 2000; VAN DER ZANDEN et al., 2009). Esse núcleo tem participação expressiva na via descendente inibitória, pois suas projeções de segunda ordem atingem outros núcleos desse sistema, dentre eles: PAG, RVM, LC (de onde partem neurônios noradrenérgicos, na sua maioria), núcleo da rafe (que apresenta projeções descendentes predominantemente serotoninérgicas) (BERTHOUD; NEUHUBER, 2000; DUBNER; REN, 2004; JÄNIG et al., 2000; MILLAN, 2002).

A relação entre nervo vago e eventos nociceptivos orofaciais tem sido descrita em alguns estudos. Em modelo de nocicepção orofacial desencadeada por formalina, a estimulação vagal reduziu comportamentos nociceptivos em ratos (BOHOTIN et al., 2003). Em modelos de nocicepção pulpar, a estimulação vagal também promoveu inibição dos eventos nociceptivos através da interação com núcleos noradrenérgicos e serotoninérgicos da via descendente inibitória (TAKEDA et al., 2002; TANIMOTO et al., 2002).

A vagotomia subdiafragmática também tem sido avaliada quanto a sua participação em eventos nociceptivos. A secção da porção subdiafragmática do nervo vago reduziu limiar mecânico de retirada de pata e aumentou a hiperalgesia induzida por bradixinina (KHASAR et al., 1998a, 1998b). Ainda sobre a vagotomia, em modelo de inflamação induzida por óleo de mostarda na ATM, a vagotomia cervical foi capaz de reverter o efeito inibitória da morfina em regiões trigeminais (BEREITER et al., 2002). Da mesma forma, o procedimento de vagotomia cervical reduziu limiares térmicos e mecânicos e a estimulação elétrica do nervo vago proporcionou inibição de respostas nociceptivas de neurônios do subnúcleo caudal do trigêmeo, em modelo de CFA na ATM de ratos (YAMAZAKI et al., 2008).

Por isso, acredita-se que a tripsina poderia agir sobre o vago de duas maneiras: 1) ativando diretamente receptores PAR-2 (através de sua clivagem) nas aferências vagais no TGI, desencadeando potenciais de ação e consequente estimulação do nervo. 2) ou indiretamente, pois se sabe que a tripsina regula enterócitos através da ativação de receptores PAR-2 na membrana apical dessas células. Essa interação promove a liberação de mediadores inflamatórios que participam não só da neurotransmissão do TGI, mas também da motilidade e secreção do mesmo (DÉRY et al., 1998; KONG et al., 1997; OSSOVSKAYA; BUNNETT, 2004). Ainda, essa sensibilização do nervo vago por mediadores inflamatórios é sustentada, também, pelas respostas imunes (incluindo hiperalgesia e dor) desencadeadas devido à liberação de mediadores por células imunes em resposta a patógenos viscerais (GOEHLER et al., 2000; VAN DER ZANDEN et al., 2009). Supõe-se, assim, que a clivagem de receptores PAR-2, através de enterócitos ou de outra via, sensibilizaria as aferências vagais por intermédio de mediadores inflamatórios e que esta estimulação vagal levaria à ativação da via descendente inibitória. Isso faria a “ponte” entre o sistema vagal e a periferia, devido às conexões existentes entre vago-NTS e estruturas participantes dessa via.

Portanto, para se elucidar corretamente se a tripsina ativa somente receptor PAR-2 ou se há participação de algum outro receptor, testes mais específicos deveriam ser conduzidos. Ainda, para confirmar a participação da via descendente inibitória na comunicação do nervo vago com a periferia no modelo de OA induzido por MIA, testes que envolvam degeneração de vias serotoninérgicas e noradrenérgicas também se revelam necessários. Ainda, sabendo-se que aferentes nociceptivos provenientes da ATM também são encontrados no gânglio nodoso (UDDMAN et al., 1998) e que este também abriga fibras vagais (MACHADO, 2000), além das ligações entre NTS e subnúcleos trigeminais (onde se encontram a maioria dos aferentes nociceptivos primários provenientes da ATM) (SESSLE, 2000), estudos verificando relações de modulação, participação ou inibição entre nervo vago, complexo trigeminal e estruturas relacionadas poderiam ser feitos para esclarecer se há interação entre essas estruturas e os testes nociceptivos avaliados nesse projeto, além da possível participação do sistema inibitório da dor.

Dessa maneira, após avaliação geral dos fármacos testados sobre os comportamentos nociceptivos avaliados, pode-se inferir que os efeitos dos AINES sobre os comportamentos de coçar com a pata traseira e repousar/dormir poderiam sugerir que estes comportamentos não dependem diretamente de PGs, mas sim de outros mediadores inflamatórios como, possivelmente, citocinas. Essa premissa poderia ser sustentada pela alteração dos comportamentos proporcionada pelas drogas de ação central e pela dexametasona, reservando características de sensibilização central, também. Ainda, o oposto pode ser observado nos comportamentos de chacoalhar de cabeça e mastigar que parecem apresentar respostas inflamatórias parcialmente mediadas por PGs, por isso sendo reduzidos por AINES, pelo corticosteroide e pelas drogas de ação central.

A avaliação das vias neuronais e mecanismos que compõe cada comportamento analisado revela-se importante, pois auxiliaria no desenvolvimento de fármacos e abordagens específicas para tais eventos. Uma vez que poderia ser discriminado a qual fase da patologia crônica esse comportamento estaria representando. A análise da ação dos fármacos testados nos dias seguintes do protocolo experimental também seria importante, pois como há distinção entre as fases do MIA, no que se refere ao componente inflamatório, a exploração e validação farmacológica dessas fases no modelo de ATM seria relevante.

Em suma, o modelo de OA induzido por MIA demonstrou ser eficaz em mimetizar as características (agudas e crônicas) da patologia também na ATM, além de responder à terapia farmacológica comum a essa condição, revelando-se promissor para o estudo das alterações e mecanismos pelos quais a patologia osteoartrítica se desenvolve nessa articulação. Ainda, novas formas estratégicas, utilizando o modelo de OA-MIA na ATM, poderiam ser propostas com o intuito de minimizar a transição do dano tecidual para a dor aguda e esta para crônica, ou na modificação e/ou paralização da doença através de novas manipulações, sejam elas farmacológicas ou não. Novos estudos sobre genômica e proteômica da dor orofacial crônica, combinadas com novos tratamentos, podem favorecer o desenvolvimento de uma abordagem individualizada e mais eficaz para os pacientes que sofrem não só de osteoartrite temporomandibular, mas de outras DTMs crônicas.

6 CONCLUSÕES

- A injeção de iodoacetato monossódico (MIA) na ATM revelou-se capaz de induzir alterações nociceptivas e, ainda, a dose de 0,5 mg de MIA foi a menor dose capaz de sustentar essas alterações durante 21 dias, revelando perfil crônico do algógeno e corroborando seu uso como modelo de OA.
- O teste de OCN e IA mostraram-se ferramentas avaliativas consistentes para comportamentos nociceptivos espontâneos e incapacitação articular temporomandibular, bem como para discriminação e mensuração de eventos nociceptivos desencadeados pelo MIA.
- A validação farmacológica, através de doses terapêuticas utilizadas na clínica médica para tratamento da osteoartrite, sustenta o papel do MIA e a confiabilidade do modelo para estudo dessa patologia.
- Ainda, a tripsina representa abordagem farmacológica promissora para controle de quadros dolorosos e inflamatórios presentes na OA temporomandibular e seu efeito é dependente da integridade das aferências vagais subdiafragmáticas. Dessa forma, a manipulação vagal pode contribuir para o efeito analgésico e anti-inflamatório da tripsina e merece estudos mais exploratórios quanto ao seu benefício.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AADR; REPORTS. **Scientific Information Statement. Temporomandibular Disorders (TMD)**. 18-24, 1996.

ABUBAKER, A O.; HEBDA, P. C.; GUNSOLLEY, J. N. Effects of sex hormones on protein and collagen content of the temporomandibular joint disc of the rat. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 54, p. 721–727, 1996.

ABOU-RAYA, A. et al. Effect of low-dose oral prednisolone on symptoms and systemic inflammation in older adults with moderate to severe knee osteoarthritis: A randomized placebo-controlled trial. **Journal of Rheumatology**, v. 41, p. 53–59, 2014.

AHMED, A. S. et al. Suppression of pain and joint destruction by inhibition of the proteasome system in experimental osteoarthritis. **Pain**, v. 153, n. 1, p. 18–26, 2012.

AHN, D. K. et al. Blockade of central cyclooxygenase (COX) pathways enhances the cannabinoid-induced antinociceptive effects on inflammatory temporomandibular joint (TMJ) nociception. **Pain**, v. 132, p. 23–32, 2007.

AHN, D. K. et al. Central cyclooxygenase inhibitors reduced IL-1 β -induced hyperalgesia in temporomandibular joint of freely moving rats. **Pain**, v. 117, p. 204–213, 2005.

ALOMAR, X. et al. Anatomy of the Temporomandibular Joint. **Seminars in Ultrasound, CT and MRI**, v. 28, p. 170–183, 2007.

ALSTERGREN, P. et al. Co-variation of neuropeptide Y, calcitonin gene-related peptide, substance P and neurokinin A in joint fluid from patients with temporomandibular joint arthritis. **Archives of Oral Biology**, v. 40, n. 2, p. 127–135, 1995.

ALSTERGREN, P. et al. The effect on joint fluid concentration of neuropeptide Y by intra-articular injection of glucocorticoid in

temporomandibular joint arthritis. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 54, p. 1–7, fev. 1996.

ALSTERGREN, P.; KOPP, S. Pain and synovial fluid concentration of serotonin in arthritic temporomandibular joints. **Pain**, v. 72, p. 137–143, 1997.

ALSTERGREN, P.; KOPP, S. Prostaglandin E2 in temporomandibular joint synovial fluid and its relation to pain and inflammatory disorders. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 58, p. 180–186, 2000.

ALVAREZ, P. et al. Synergistic antinociceptive effects of ketamine and morphine in the orofacial capsaicin test in the rat. **Anesthesiology**, v. 99, n. 4, p. 969–975, 2003.

AMIN, A. R. et al. Superinduction of cyclooxygenase-2 activity in human osteoarthritis- affected cartilage. Influence of nitric oxide. **Journal of Clinical Investigation**, v. 99, n. 6, p. 1231–1237, 1997.

ANDERSEN, M. L.; TUFIK, S. Altered sleep and behavioral patterns of arthritic rats. **Sleep Research Online**, v. 3, n. 4, p. 161–167, 2000.

ARTHURI, M. T. et al. Peripheral effect of a kappa opioid receptor antagonist on nociception evoked by formalin injected in TMJ of pregnant rats. **Life Sciences**, v. 76, p. 1177–1188, 2005.

ARUN, O. et al. The analgesic efficacy of intra-articular acetaminophen in an experimental model of carrageenan-induced arthritis. **Pain Research & Management**, v. 18, n. 5, p. 63–67, 2013.

AUVENSHINE, R. C. Acute vs. chronic pain. **Texas Dental Journal**, v. 117, n. 7, p. 14–20, 2000.

AYOUB, S. S. et al. Acetaminophen-induced hypothermia in mice is mediated by a prostaglandin endoperoxide synthase 1 gene-derived protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 30, p. 11165–11169, 2004.

B. STAM, W.; JANSEN, J. P.; TAYLOR, S. D. Efficacy of Etoricoxib, Celecoxib, Lumiracoxib, Non-Selective NSAIDs, and Acetaminophen in Osteoarthritis: A Mixed Treatment Comparison. **The Open Rheumatology Journal**, v. 6, p. 6–20, 2012.

BARNEY, B. B. A Study of Parenzyme and Varidase on the Postoperative Rhinoplasties of Two Sets of Identical Twins. **Plastic & Reconstructive Surgery**, v. 40, n. 3, p. 263–267, 1967.

BARVE, R. A. et al. Transcriptional profiling and pathway analysis of monosodium iodoacetate-induced experimental osteoarthritis in rats: relevance to human disease. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 15, p. 1190–1198, 2007.

BELLINGER, L. L. et al. Capsaicin sensitive neurons role in the inflamed TMJ acute nociceptive response of female and male rats. **Physiology and Behavior**, v. 90, p. 782–789, 2007.

BELTRÁN, J. et al. Comparison of dexketoprofen trometamol and ketoprofen in the treatment of osteoarthritis of the knee. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 38, p. 745–80S, dez. 1998.

BEREITER, D. A.; BENETTI, A. P. Amino acid release at the spinomedullary junction after inflammation of the TMJ region in male and female rats. **Pain**, v. 126, p. 175–183, 2006.

BEREITER, D. A.; BEREITER, D. F. Morphine and NMDA receptor antagonism reduce c-fos expression in spinal trigeminal nucleus produced by acute injury to the TMJ region. **Pain**, v. 85, p. 65–77, 2000.

BEREITER, D. A.; BEREITER, D. F.; RAMOS, M. Vagotomy prevents morphine-induced reduction in Fos-like immunoreactivity in trigeminal spinal nucleus produced after TMJ injury in a sex-dependent manner. **Pain**, v. 96, p. 205–213, 2002.

BERNARDIS, L. L.; BELLINGER, L. L. The lateral hypothalamic area revisited: ingestive behavior. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 20, n. 2, p. 189–287, 1996.

BERRIDGE, K. C.; ROBINSON, T. E. Parsing reward. **Trends in Neurosciences**, v. 26, n. 9, p. 507–513, 2003.

BERTHOUD, H. R.; NEUHUBER, W. L. Functional and chemical anatomy of the afferent vagal system. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 85, p. 1–17, 2000.

BEYREUTHER, B.; CALLIZOT, N.; STÖHR, T. Antinociceptive efficacy of lacosamide in the monosodium iodoacetate rat model for osteoarthritis pain. **Arthritis Research & Therapy**, v. 9, n. 1, p. R14, 2007.

BJORDAL, J. M. et al. Non-steroidal anti-inflammatory drugs, including cyclo-oxygenase-2 inhibitors, in osteoarthritic knee pain: meta-analysis of randomised placebo controlled trials. **BMJ (Clinical Research ed.)**, v. 329, n. 7478, p. 1317, 2004.

BJØRNLAND, T.; GJÆRUM, A. A.; MØYSTAD, A. Osteoarthritis of the temporomandibular joint: An evaluation of the effects and complications of corticosteroid injection compared with injection with sodium hyaluronate. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 34, p. 583–589, 2007.

BLACKBURN-MUNRO, G.; JENSEN, B. S. The anticonvulsant retigabine attenuates nociceptive behaviours in rat models of persistent and neuropathic pain. **European Journal of Pharmacology**, v. 460, n. 2-3, p. 109–116, 2003.

BLANCO, F. J. et al. Effect of antiinflammatory drugs on COX-1 and COX-2 activity in human articular chondrocytes. **The Journal of Rheumatology**, v. 26, n. 6, p. 1366–1373, 1999.

BLOCK, J. A. Osteoarthritis: OA guidelines: improving care or merely codifying practice? **Nature Reviews Rheumatology**, v. 10, n. 6, p. 324–326, 2014.

BOBACZ, K. Pharmacologic treatment of hand-, knee- and hip-osteoarthritis. **Wiener Medizinische Wochenschrift**, v. 163, p. 236–242, 2013.

BOHOTIN, C. et al. Vagus nerve stimulation attenuates heat- and formalin-induced pain in rats. **Neuroscience Letters**, v. 351, p. 79–82, 2003.

BOLETA-CERANTO, D. D. C. F.; VEIGA, M. C. F. DE A.; ARSATI, F. Efeito da dexametasona e do meloxicam sobre o extravasamento plasmático induzido por carragenina na atm de ratos. **Revista Odonto Ciência**, v. 20, n. 50, p. 354–360, 2005.

BONAVITA, V.; DE SIMONE, R. Towards a definition of comorbidity in the light of clinical complexity. **Neurological Sciences**, v. 29, p. 99–102, maio 2008.

BONJARDIM, L. R. et al. Nociceptive behavior induced by mustard oil injection into the temporomandibular joint is blocked by a peripheral non-opioid analgesic and a central opioid analgesic. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 91, n. 3, p. 321–326, 2009.

BOSSUT, D. F.; MAIXNER, W. Effects of cardiac vagal afferent electrostimulation on the responses of trigeminal and trigeminothalamic neurons to noxious orofacial stimulation. **Pain**, v. 65, p. 101–109, 1996.

BOTTING, R. M. Mechanism of action of acetaminophen: is there a cyclooxygenase 3? **Clinical Infectious Diseases**, v. 31, n. 5, p. 202–210, 2000.

BOTTING, R.; AYOUB, S. S. COX-3 and the mechanism of action of paracetamol/acetaminophen. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 72, p. 85–87, 2005.

BOVE, S. E. et al. Weight bearing as a measure of disease progression and efficacy of anti-inflammatory compounds in a model of

monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 11, p. 821–830, 2003.

BOYD, S. K. et al. Long-term periarticular bone adaptation in a feline knee injury model for post-traumatic experimental osteoarthritis. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 13, p. 235–242, 2005.

BRATTSAND, R.; LINDEN, M. Cytokine modulation by glucocorticoids: mechanisms and actions in cellular studies. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 10, n 2, p. 81–90; 1996.

BURNHAM, L. J.; DICKENSON, A. H. The antinociceptive effect of milnacipran in the monosodium iodoacetate model of osteoarthritis pain and its relation to changes in descending inhibition. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 344, p. 696–707, 2013.

CADY, R. J. et al. Calcitonin gene-related peptide promotes cellular changes in trigeminal neurons and glia implicated in peripheral and central sensitization. **Molecular Pain**, v. 7, n. 1, p. 94, 2011.

CAI, Z.; MCCASLIN, P. P. Amitriptyline, desipramine, cyproheptadine and carbamazepine, in concentrations used therapeutically, reduce kainate- and N-methyl-D-aspartate-induced intracellular Ca²⁺ levels in neuronal culture. **European Journal of Pharmacology**, v. 219, n. 1, p. 53–7, 1992.

CAIRNS, B. E. Pathophysiology of TMD pain - basic mechanisms and their implications for pharmacotherapy. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 37, p. 391–410, 2010.

CAIRNS, B. E.; SESSLE, B. J.; HU, J. W. Characteristics of glutamate-evoked temporomandibular joint afferent activity in the rat. **Journal of Neurophysiology**, v. 85, p. 2446–2454, 2001.

CAOUS, C. A.; DE SOUSA BUCK, H.; LINDSEY, C. J. Neuronal connections of the paratrigeminal nucleus: a topographic analysis of neurons projecting to bulbar, pontine and thalamic nuclei related to

cardiovascular, respiratory and sensory functions. **Autonomic Neuroscience : Basic & Clinical**, v. 94, n. 1-2, p. 14–24, 2001.

CARLESON, J. et al. A model for experimental induction of acute temporomandibular joint inflammation in rats: effects of substance P(SP) on neuropeptide-like immunoreactivity. **Life Sciences**, v. 59, n. 15, p. 1193–1201, 1996.

CARLESON, J. et al. Effects of capsaicin in temporomandibular joint arthritis in rats. **Archives of Oral Biology**, v. 42, n. 12, p. 869–876, 1997.

CEVIDANES, L. H. S. et al. Quantification of condylar resorption in temporomandibular joint osteoarthritis. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v. 110, n. 1, p. 110–117, 2010.

CHANDRAN, P. et al. Pharmacological modulation of movement-evoked pain in a rat model of osteoarthritis. **European Journal of Pharmacology**, v. 613, p. 39–45, 2009.

CHASSAING, B. et al. Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome. **Nature**, v. 519, n. 7541, p. 92–96, 2015.

CHICRE-ALCÂNTARA, T. C. et al. Local Kappa Opioid Receptor Activation Decreases Temporomandibular Joint Inflammation. **Inflammation**, v. 35, n. 1, p. 371–376, 2012.

CIALDAI, C. et al. Comparison between oral and intra-articular antinociceptive effect of dexketoprofen and tramadol combination in monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 714, n. 1-3, p. 346–351, 2013.

CLAVIER, R. M. Afferent projections to the self-stimulation regions of the dorsal pons, including the locus coeruleus, in the rat as demonstrated by the horseradish peroxidase technique. **Brain Research Bulletin**, v. 4, p. 497–504, 1979.

CLEDES, G. et al. Validation of a chemical osteoarthritis model in rabbit temporomandibular joint: a compliment to biomechanical models. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 35, p. 1026–1033, 2006.

COGGESHALL, R. E.; CARLTON, S. M. Receptor localization in the mammalian dorsal horn and primary afferent neurons. **Brain Research Reviews**, v. 24, p. 28–66, 1997.

COLUZZI, F.; MATTIA, C. Mechanism-based treatment in chronic neuropathic pain: the role of antidepressants. **Current Pharmaceutical Design**, v. 11, n. 23, p. 2945–2960, 2005.

COMBE, R.; BRAMWELL, S.; FIELD, M. J. The monosodium iodoacetate model of osteoarthritis: A model of chronic nociceptive pain in rats? **Neuroscience Letters**, v. 370, p. 236–240, 2004.

DAMIANI, D.; DAMIANI, D. Sinalização cerebral do apetite. **Revista Brasileira de Clínica Médica**, v. 9, n. 2, p. 138–145, 2011.

DAWES, J. M. et al. Chemokine expression in peripheral tissues from the monosodium iodoacetate model of chronic joint pain. **Molecular Pain**, v. 9, n. 1, p. 57, 2013.

DE BONT, L. G.; DIJKGRAAF, L. C.; STEGENGA, B. Epidemiology and natural progression of articular temporomandibular disorders. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, v. 83, n. 1, p. 72–76, 1997.

DE KANTER, R. J. et al. Prevalence in the Dutch adult population and a meta-analysis of signs and symptoms of temporomandibular disorder. **Journal of Dental Research**, v. 72, n. 11, p. 1509–1518, 1993.

DE LEEUW, R. **Orofacial Pain: Guidelines for Assessment, Diagnosis and Management**. 4^a ed. Chicago: Quintessence Publishing, 2008.

DEEKS, J. J.; SMITH, L. A.; BRADLEY, M. D. Efficacy, tolerability, and upper gastrointestinal safety of celecoxib for treatment of

osteoarthritis and rheumatoid arthritis: systematic review of randomised controlled trials. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 325, n. 7365, p. 619, 2002.

DENADAI-SOUZA, A et al. PAR(2) and temporomandibular joint inflammation in the rat. **Journal of Dental Research**, v. 89, p. 1123–1128, 2010.

DÉRY, O. et al. Proteinase-activated receptors: novel mechanisms of signaling by serine proteases. **American Physiological Society**, v. 274, n. (Cell Physiol. 43), p. C1429–C1452, 1998.

DIJKGRAAF, L. C. et al. Function, biochemistry, and metabolism of the normal synovial membrane of the temporomandibular joint: A review of the literature. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 54, p. 95–100, 1996b.

DIJKGRAAF, L. C. et al. Structure of the normal synovial membrane of the temporomandibular joint: a review of the literature. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 54, p. 332–338, 1996a.

DIJKGRAAF, L. C. et al. The Structure, Biochemistry, and Metabolism of Osteoarthritic Cartilage: A Review of the Literature. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 53, p. 1182–1192, 1995.

DIONNE, R. A. Pharmacologic advances in orofacial pain: from molecules to medicine. **Journal of Dental Education**, v. 65, n. December, p. 1393–1403, 2001.

DIONNE, R. A. Pharmacologic treatments for temporomandibular disorders. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, v. 83, p. 134–142, 1997.

DOST, R.; ROSTOCK, A.; RUNDDELDT, C. The anti-hyperalgesic activity of retigabine is mediated by KCNQ potassium channel activation. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 369, n. 4, p. 382–90, 2004.

DO NASCIMENTO, G. C.; LEITE-PANISSI, C. R. A. Time-dependent analysis of nociception and anxiety-like behavior in rats submitted to persistent inflammation of the temporomandibular joint. **Physiology and Behavior**, v. 125, p. 1–7, 2014.

DUBNER, R.; REN, K. Brainstem mechanisms of persistent pain following injury. **Journal of Orofacial Pain**, v. 18, p. 299–305, 2004.

DURHAM, J. Temporomandibular disorders (TMD): an overview. **Oral Surgery**, v. 1, p. 60–68, 2008.

DUYGU, G. et al. The effects of high molecular weight hyaluronic acid (Hylan G-F 20) on experimentally induced temporomandibular joint osteoarthritis: Part II. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 40, p. 1406–1413, 2011.

EGERMARK, I.; CARLSSON, G. E.; MAGNUSSON, T. A 20-year longitudinal study of subjective symptoms of temporomandibular disorders from childhood to adulthood. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 59, p. 40–48, 2001.

EL-HAKIM, I. E. S.; ABDEL-HAMID, I. S.; BADER, A. Temporomandibular joint (TMJ) response to intra-articular dexamethasone injection following mechanical arthropathy: A histological study in rats. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 34, p. 305–310, 2005.

EMBREE, M. et al. Role of subchondral bone during early-stage experimental TMJ Osteoarthritis. **Journal of Dental Research**, v. 90, p. 1331-1338, 2011.

ERVOLINO, E. Inervação autonômica da articulação temporomandibular em condições de normalidade e, padrão de ativação neuronal no tronco encefálico durante a vigência de artrite no complexo articular temporomandibular. 2009. 149f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2009.

ESSEX, M.; BHADRA, P.; SANDS, G. Efficacy and Tolerability of Celecoxib versus Naproxen in Patients with Osteoarthritis of the Knee: A Randomized, Double-Blind, Double-Dummy Trial. **Journal of International Medical Research**, v. 40, n. 4, p. 1357–1370, 2012.

FARRAR, W. B.; MCCARTY, W. L. J. The TMJ dilemma. **Journal of the Alabama Dental Association**, v. 63, p. 19–26, 1979.

FERJAN, I.; LIPNIK-ŠTANGELJ, M. Chronic pain treatment: The influence of tricyclic antidepressants on serotonin release and uptake in mast cells. **Mediators of Inflammation**, v. 2013, p. 1–7, 2013.

FERRELL, W. R. et al. Essential role for proteinase-activated receptor-2 in arthritis. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 111, n. 1, p. 35–41, 2003.

FILHO, D. C.; PÊGO, R. S.; FERREIRA, Y. F. Zona bilaminar: aspectos anatômicos, histológicos e funcionais. **Arquivos Brasileiros de Odontologia**, v. 6, n. 2, p. 71–77, 2010.

FISCHER, L. et al. The Influence of Sex and Ovarian Hormones on Temporomandibular Joint Nociception in Rats. **Journal of Pain**, v. 9, n. 7, p. 630–638, 2008.

FLAKE, N. M.; GOLD, M. S. Inflammation alters sodium currents and excitability of temporomandibular joint afferents. **Neuroscience Letters**, v. 384, p. 294–299, 2005.

FRYER, J. D.; LUKAS, R. J. Antidepressants noncompetitively inhibit nicotinic acetylcholine receptor function. **Journal of Neurochemistry**, v. 72, n. 3, p. 1117–24, 1999.

FUCHS, P. N. et al. Acute amitriptyline treatment produces non-opioid-mediated analgesia in the formalin and bee venom tests. **Pathophysiology**, v. 3, p. 227–231, 1996.

GAO, C. et al. Serine proteases excite myenteric neurons through protease-activated receptors in guinea pig small intestine. **Gastroenterology**, v. 123, p. 1554–1564, 2002.

GARNERO, P. et al. Cross-sectional association of 10 molecular markers of bone, cartilage, and synovium with disease activity and radiological joint damage in patients with hip osteoarthritis: the ECHODIAH cohort. **The Journal of Rheumatology**, v. 32, n. 4, p. 697–703, 2005.

GILRON, I. et al. Neuropathic pain: A practical guide for the clinician. **Canadian Medical Association Journal**, v. 175, n. 3, p. 265–275, 2006.

GOEHLER, L. E. et al. Vagal immune-to-brain communication: A visceral chemosensory pathway. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 85, p. 49–59, 2000.

GOLDENBERG, M. M. Celecoxib, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor for the treatment of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. **Clinical Therapeutics**, v. 21, n. 9, p. 1497–1513, 1999.

GOMES, K. et al. Estudo comparativo experimental do adjuvante completo de Freund e formalina inoculados na articulação temporomandibular de ratos e consequentes alterações comportamentais por possível dor orofacial. **Revista Dor**, v. 10, n. 2, p. 141–149, 2009.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica**. 11 ed. Porto Alegre: AMGH Editora Ltda., 2010.

GREENE, C. S. Managing the care of patients with temporomandibular disorders: a new guideline for care. **Journal of the American Dental Association**, v. 141, p. 1086–1088, 2010.

GUARDA-NARDINI, L. et al. Comparison of 2 hyaluronic acid drugs for the treatment of temporomandibular joint osteoarthritis. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 70, n. 11, p. 2522–2530, 2012.

GUINGAMP, C. et al. Mono-iodoacetate-induced experimental osteoarthritis: A dose-response study of loss of mobility, morphology, and biochemistry. **Arthritis and Rheumatism**, v. 40, n. 9, p. 1670–1679, 1997.

GÜLER, N. et al. Sodium iodoacetate induced osteoarthrosis model in rabbit temporomandibular joint: CT and histological study (Part I). **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 40, p. 1289–1295, 2011.

GUZMAN, R. E. et al. Mono-Iodoacetate-Induced Histologic Changes in Subchondral Bone and Articular Cartilage of Rat Femorotibial Joints: An Animal Model of Osteoarthritis. **Toxicologic Pathology**, v. 31, p. 619–624, 2003.

HAKETA, T. et al. Difficulty of Food Intake in Patients with Temporomandibular Disorders. **The International Journal of Prosthodontics**, v. 19, p. 266–270, 2006.

HALL, H.; OGREN, S. O. Effects of antidepressant drugs on different receptors in the brain. **European Journal of Pharmacology**, v. 70, n. 3, p. 393–407, 1981.

HAN, S. R. et al. Early dexamethasone relieves trigeminal neuropathic pain. **Journal of Dental Research**, v. 89, p. 915–920, 2010.

HARKINS, S. et al. Administration of clonazepam in the treatment of TMD and associated myofascial pain: a double-blind pilot study. **Journal of Craniomandibular Disorders**, v. 5, n. 3, p. 179–86, 1991.

HARPER, R. P. et al. Meal Pattern Analysis in Response to Temporomandibular Joint Inflammation in the Rat. **Journal of Dental Research**, v. 79, p. 1704–1711, 2000.

HARPER, R. P. et al. Modulation of the inflammatory response in the rat TMJ with increasing doses of complete Freund's adjuvant. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 9, p. 619–624, 2001.

HARTWIG, A. C. et al. Characterization and Opioid Modulation of Inflammatory Temporomandibular Joint Pain in the Rat. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 61, n. 03, p. 1302–1309, 2003.

HASHIMOTO, M. et al. MolecularNetwork of Cartilage Homeostasis andOsteoarthritis. **Medicinal Research Reviews**, v. 28, n. 3, p. 464–481, 2008.

HAWKER, G. A. et al. Understanding the pain experience in hip and knee osteoarthritis - an OARSI/OMERACT initiative. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 16, p. 415–422, 2008.

HERMAN, C. R. et al. The effectiveness of adding pharmacologic treatment with clonazepam or cyclobenzaprine to patient education and self-care for the treatment of jaw pain upon awakening: a randomized clinical trial. **Journal of Orofacial Pain**, v. 16, n. 1, p. 64–70, 2002.

HERSH, E. V.; BALASUBRAMANIAM, R.; PINTO, A. Pharmacologic Management of Temporomandibular Disorders. **Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America**, v. 20, p. 197–210, 2008.

HOCHMAN, J. R. et al. The nerve of osteoarthritis pain. **Arthritis Care and Research**, v. 62, n. 7, p. 1019–1023, 2010.

HOFFMANN, R. G. et al. Temporomandibular Disorders and Associated Clinical Comorbidities. **The Clinical Journal of Pain**, v. 27, n. 3, p. 268–274, 2011.

HÖGESTÄTT, E. D. et al. Conversion of acetaminophen to the bioactive N-acylphenolamine AM404 via fatty acid amide hydrolase-dependent arachidonic acid conjugation in the nervous system. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 36, p. 31405–31412, 2005.

HONDA, K. Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor suppress osteoclastic differentiation by inducing PGE2 production in chondrocytes. **Journal of Oral Science**, v. 53, n. 1, p. 87–96, 2011.

HUEBNER, K. D.; SHRIVE, N. G.; FRANK, C. B. Dexamethasone inhibits inflammation and cartilage damage in a new model of post-traumatic osteoarthritis. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 32, n. 4, p. 566–572, 2014.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v. 30, p. 103–114, 1987.

HURLEY, R. W. et al. Gabapentin and pregabalin can interact synergistically with naproxen to produce antihyperalgesia. **Anesthesiology**, v. 97, n. 5, p. 1263–1273, 2002.

ICHIKAWA, H. et al. Fine structure of calcitonin gene-related peptide-immunoreactive nerve fibres in the rat temporomandibular joint. **Archives of Oral Biology**, v. 35, n. 9, p. 727–730, 1990.

ICHIKAWA, H. et al. Peptidergic innervation of the temporomandibular disk in the rat. **Experientia**, v. 45, p. 303–304, 1989.

INGAWALÉ, S.; GOSWAMI, T. Temporomandibular joint: Disorders, treatments, and biomechanics. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 37, n. 5, p. 976–996, 2009.

INNERFIELD, I.; ANGRIST, A.; SCHWARZ, A. Parenteral administration of trypsin - clinical effect in 538 patients. **The Journal of the American Medical Association**, v. 152, n. 7, p. 597–605, 1953.

ISHIDA, T.; YABUSHITA, T.; ONO, T. Functional reversibility of temporomandibular joint mechanoreceptors. **Archives of Oral Biology**, v. 58, n. 9, p. 1078–1083, 2013.

IVANAVICIUS, S. P. et al. Structural pathology in a rodent model of osteoarthritis is associated with neuropathic pain: Increased expression of ATF-3 and pharmacological characterisation. **Pain**, v. 128, p. 272–282, 2007.

IWATA, K. et al. Medullary dorsal horn neuronal activity in rats with persistent temporomandibular joint and perioral inflammation. **Journal of Neurophysiology**, v. 82, p. 1244–1253, 1999.

JÄNIG, W. et al. The role of vagal visceral afferents in the control of nociception. **Progress in Brain Research**, v. 122, n. 2, p. 273–287, 2000.

JANUSZ, M. J. et al. Moderation of iodoacetate-induced experimental osteoarthritis in rats by matrix metalloproteinase inhibitors. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 9, p. 751–760, 2001.

JOYCE, D. A.; STEER, J. H.; KLODA, A. Dexamethasone antagonizes IL-4 and IL-10-induced release of IL-1RA by monocytes but augments IL-4-, IL-10-, and TGF-beta-induced suppression of TNF-alpha release. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 16, n. 7, p. 511–7, 1996.

JOZWIAK-BEBENISTA, M.; NOWAK, J. Z. Paracetamol: Mechanism of action, applications and safety concern. **Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research**, v. 71, n. 1, p. 11–23, 2014.

KALBHEN, D. A. Chemical model of osteoarthritis - a pharmacological evaluation. **The Journal of Rheumatology**, v. 14, p. 130–131, 1987.

KALFF, K. M. et al. Pre-treatment with capsaicin in a rat osteoarthritis model reduces the symptoms of pain and bone damage induced by monosodium iodoacetate. **European Journal of Pharmacology**, v. 641, n. 2-3, p. 108–113, 2010.

KANEYAMA, K. et al. Analysis of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6, interleukin-1beta, soluble tumor necrosis factor receptors I and II, interleukin-6 soluble receptor, interleukin-1 soluble receptor type II, interleukin-1 receptor antagonist, and protein in the synovial fluid of patients with temporomandibular joint disorders. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, and Endodontics**, v. 99, p. 276–284, 2005.

KELLY, S. et al. Spontaneous firing in C-fibers and increased mechanical sensitivity in A-fibers of knee joint-associated mechanoreceptive

primary afferent neurones during MIA-induced osteoarthritis in the rat. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 20, n. 4, p. 305–313, 2012.

KELLY, S.; DOBSON, K. L.; HARRIS, J. Spinal nociceptive reflexes are sensitized in the monosodium iodoacetate model of osteoarthritis pain in the rat. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 21, n. 9, p. 1327–1335, 2013.

KELSO, E. B. et al. Therapeutic promise of proteinase-activated receptor-2 antagonism in joint inflammation. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 316, n. 3, p. 1017–1024, 2006.

KERINS, C. A. et al. Meal pattern changes associated with temporomandibular joint inflammation/pain in rats; analgesic effects. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 75, p. 181–189, 2003.

KERINS, C. A. et al. Specificity of meal pattern analysis as an animal model of determining temporomandibular joint inflammation/pain. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 34, p. 425–431, 2005.

KERINS, C. et al. A role for cyclooxygenase II inhibitors in modulating temporomandibular joint inflammation from a meal pattern analysis perspective. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 62, p. 989–995, 2004.

KHASAR, S. G. et al. Modulation of bradykinin-induced mechanical hyperalgesia in the rat by activity in abdominal vagal afferents. **Journal of Neuroscience**, v. 10, p. 435–444, 1998a.

KHASAR, S. G. et al. Vagotomy-induced enhancement of mechanical hyperalgesia in the rat is sympathoadrenalmediated. **Journal of Neuroscience**, v. 18, p. 3043–3049, 1998b.

KIDO, M. A. et al. The peripheral distribution of trigeminal nerve fibres in the rat temporomandibular joint studied by an anterograde axonal transport method with wheat germ agglutinin-horseradish peroxidase. **Archives of Oral Biology**, v. 36, n. 5, p. 397–400, 1991.

KIDO, M. A. et al. Topography and distribution of sympathetic nerve fibers in the rat temporomandibular joint: immunocytochemistry and ultrastructure. **Anatomy and Embryology**, v. 203, n. 5, p. 357–366, 2001.

KIKUCHI, T.; SAKUTA, T.; YAMAGUCHI, T. Intra-articular injection of collagenase induces experimental osteoarthritis in mature rabbits. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 6, n. 3, p. 177–86, 1998.

KIM, J. H. et al. Effectiveness of bone scans in the diagnosis of osteoarthritis of the temporomandibular joint. **Dentomaxillofacial Radiology**, v. 41, p. 224–229, 2012.

KIMOS, P. et al. Analgesic action of gabapentin on chronic pain in the masticatory muscles: A randomized controlled trial. **Pain**, v. 127, n. 1, p. 151–160, 2007.

KIRKUP, A. J.; BRUNSDEN, A. M.; GRUNDY, D. Receptors and Transmission in the Brain-Gut Axis: Potential for Novel Therapies: I. Receptors on visceral afferents. **American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 280, n. 5, p. G787–794, 2001.

KNECHT, W. et al. Trypsin IV or mesotrypsin and p23 cleave protease-activated receptors 1 and 2 to induce inflammation and hyperalgesia. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 36, p. 26089–26100, 2007.

KONG, W. et al. Luminal trypsin may regulate enterocytes through proteinase-activated receptor 2. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, p. 8884–8889, 1997.

KOOLSTRA, J. H. Dynamics of the human masticatory system. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v. 13, n. 4, p. 366–376, 2002.

KOPP, S. The Influence of Neuropeptides, Serotonin, and Interleukin 1B on Temporomandibular Joint Pain and Inflammation. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 56, p. 189–191, 1998.

KOPP, S.; AKERMAN, S.; NILNER, M. Short-term effects of intra-articular sodium hyaluronate, glucocorticoid, and saline injections on rheumatoid arthritis of the temporomandibular joint. **Journal of Craniomandibular Disorders : Facial & Oral Pain**, v. 5, n. 4, p. 231–8, 1991.

KORSZUN, A et al. The relationship between temporomandibular disorders and stress-associated syndromes. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, v. 86, p. 416–420, 1998.

KRAMER, P. R. et al. Measuring persistent temporomandibular joint nociception in rats and two mice strains. **Physiology and Behavior**, v. 99, n. 5, p. 669–678, 2010.

KRAMER, P. R.; BELLINGER, L. L. Modulation of temporomandibular joint nociception and inflammation in male rats after administering a physiological concentration of 17 β -estradiol. **European Journal of Pain**, v. 17, n. 2, p. 174–184, 2013.

KRAMER, P. R.; BELLINGER, L. L. Reduced GABAA receptor α 6 expression in the trigeminal ganglion enhanced myofascial nociceptive response. **Neuroscience**, v. 245, p. 1–11, 2013.

KUBOTA, E. et al. Synovial fluid cytokines and proteinases as markers of temporomandibular joint disease. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 56, p. 192–198, 1998.

KWONG, K. et al. Thrombin and trypsin directly activate vagal C-fibres in mouse lung via protease-activated receptor-1. **The Journal of Physiology**, v. 588, n. 7, p. 1171–1177, 2010.

LAI, Y. C. et al. Intraarticular induction of interleukin-1 β expression in the adult mouse, with resultant temporomandibular joint pathologic changes, dysfunction, and pain. **Arthritis and Rheumatism**, v. 54, n. 4, p. 1184–1197, 2006.

LAM, D. K. et al. Novel Animal Models of Acute and Chronic Cancer Pain: A Pivotal Role for PAR2. **Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 41, p. 14178–14183, 2012.

LANDI, N. et al. Sexual hormone serum levels and temporomandibular disorders. A preliminary study. **Gynecological Endocrinology**, v. 20, p. 99–103, 2005.

LEE, J. Y. et al. A longitudinal study on the osteoarthritic change of the temporomandibular joint based on 1-year follow-up computed tomography. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, v. 40, n. 8, p. e223–e228, 2012.

LEIGH, T. J. et al. Comparison of sleep in osteoarthritic patients and age and sex matched healthy controls. **Annals of The Rheumatic Diseases**, v. 47, n. 1, p. 40–2, 1988.

LERESCHE, L. Epidemiology of temporomandibular disorders: implications for the investigation of etiologic factors. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 8, n. 3, p. 291–305, 1997.

LERESCHE, L. et al. Changes in temporomandibular pain and other symptoms across the menstrual cycle. **Pain**, v. 106, p. 253–261, 2003.

LIST, T. et al. Intra-articular morphine as analgesic in temporomandibular joint arthralgia/osteoarthritis. **Pain**, v. 94, p. 275–282, 2001.

LIST, T.; AXELSSON, S.; LEIJON, G. Pharmacologic interventions in the treatment of temporomandibular disorders, atypical facial pain, and burning mouth syndrome. A qualitative systematic review. **Journal of Orofacial Pain**, v. 17, p. 301–310, 2003.

MACFARLANE, S. R. et al. Proteinase activated receptor 2: **Pharmacological Reviews**, v. 53, n. 2, p. 245–282, 2001.

MACHADO, A. B. M. **Neuroanatomia funcional**. 2^a ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2000. 363 p.

MACHON, V.; HIRJAK, D.; LUKAS, J. Therapy of the osteoarthritis of the temporomandibular joint. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, v. 39, n. 2, p. 127–130, 2011.

MADLAND, G.; NEWTON-JOHN, T.; FEINMANN, C. Chronic idiopathic orofacial pain: 1: What is the evidence base? **British Dental Journal**, v. 191, n. 1, p. 22–24, 2001.

MARTEL-PELLETIER, J.; PELLETIER, J. P.; FAHMI, H. Cyclooxygenase-2 and Prostaglandins in Articular Tissues. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 33, n. 3, p. 155–167, 2003.

MASCARO, M. B. et al. O complexo trigeminal e as desordens da motricidade mandibular. **ConScientiae Saúde**, v. 7, n. 4, p. 449–456, 2008.

MATSON, D. J. et al. Inflammation-induced reduction of spontaneous activity by adjuvant: A novel model to study the effect of analgesics in rats. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 320, n. 1, p. 194–201, 2007.

MCALINDON, T. E. et al. OARSI guidelines for the non-surgical management of knee osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 22, n. 3, p. 363–388, 2014.

MCCARBERG, B.; TENZER, P. Complexities in the pharmacologic management of osteoarthritis pain. **Current Medical Research and Opinion**, v. 29, n. 5, p. 539–548, 2013.

MCDERMOTT, A. M. et al. The burden of neuropathic pain: results from a cross-sectional survey. **European Journal of Pain**, v. 10, n. 2, p. 127–135, 2006.

MEYER-HOFFERT, U. et al. Trypsin induces epidermal proliferation and inflammation in murine skin. **Experimental Dermatology**, v. 13, n. 5, p. 234–241, 2004.

MICÓ, J. A. et al. Antidepressants and pain. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 27, n. 7, p. 348–354, 2006.

MIIKE, S.; MCWILLIAM, A S.; KITA, H. Trypsin induces activation and inflammatory mediator release from human eosinophils through protease-activated receptor-2. **Journal of Immunology**, v. 167, p. 6615–6622, 2001.

MILAM S.B., Z. G. . S. J. P. Oxidative stress and degenerative temporomandibular. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, p. 214–223, 1998.

MILLAN, M. J. Descending control of pain. **Progress in Neurobiology**, v. 66, p. 355–474, 2002.

MIRANDA, H. F.; SIERRALTA, F.; PRIETO, J. C. Synergism between NSAIDs in the orofacial formalin test in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 92, n. 2, p. 314–318, 2009.

MOHAN, G. et al. Application of in vivo micro-computed tomography in the temporal characterisation of subchondral bone architecture in a rat model of low-dose monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis. **Arthritis Research & Therapy**, v. 13, p. R210, 2011.

MOHAN, G. et al. Pre-emptive, early, and delayed alendronate treatment in a rat model of knee osteoarthritis: Effect on subchondral trabecular bone microarchitecture and cartilage degradation of the tibia, bone/cartilage turnover, and joint discomfort. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 21, n. 10, p. 1595–1604, 2013.

MOON, S. J. et al. Augmented chondroprotective effect of coadministration of celecoxib and rebamipide in the monosodium iodoacetate rat model of osteoarthritis. **Archives of Pharmacal Research**, v. 36, p. 116–124, 2013.

MOON, S. J. et al. Rebamipide attenuates pain severity and cartilage degeneration in a rat model of osteoarthritis by downregulating

oxidative damage and catabolic activity in chondrocytes. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 20, p. 1426–1438, 2012.

MORGAN, J. R.; GEBHART, G. F. Characterization of a Model of Chronic Orofacial Hyperalgesia in the Rat: Contribution of NAV 1.8. **Journal of Pain**, v. 9, n. 6, p. 522–531, 2008.

MURPHY, M. K. Temporomandibular Disorders: A Review of Etiology, Clinical Management, and Tissue Engineering Strategies. **Oral & Craniofacial Tissue Engineering**, v. 1, n. 3, p. 205–226, 2011.

NAGASE, H.; KUMAKURA, S.; SHIMADA, K. Establishment of a novel objective and quantitative method to assess pain-related behavior in monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis in rat knee. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 65, n. 1, p. 29–36, 2012.

NAVEEN, S. V. et al. Histology, glycosaminoglycan level and cartilage stiffness in monoiodoacetate-induced osteoarthritis: Comparative analysis with anterior cruciate ligament transection in rat model and human osteoarthritis. **International Journal of Medical Sciences**, v. 11, n. 1, p. 97–105, 2014.

NEDAJ, S. G. et al. Osteoarthritis-like damage of cartilage in the temporomandibular. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 19, n. 4, p. 458–465, 2011.

NELSON, A. E. et al. A systematic review of recommendations and guidelines for the management of osteoarthritis: The Chronic Osteoarthritis Management Initiative of the U.S. Bone and Joint Initiative. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 43, p. 701–712, 2014.

NEUGEBAUER, V.; SCHAIBLE, H. G.; SCHMIDT, R. F. Sensitization of articular afferents to mechanical stimuli by bradykinin. **Pflügers Archiv : European journal of physiology**, v. 415, n. 3, p. 330–5, dez. 1989.

NICOL, G. D.; KLINGBERG, D. K.; VASKO, M. R. Prostaglandin E2 increases calcium conductance and stimulates release of substance P in avian sensory neurons. **The Journal of Neuroscience**, v. 12, n. 5, p. 1917–27, 1992.

NOBLE, H. W. Comparative functional anatomy of temporomandibular joint. **Oral Sciences Reviews**, v. 2, p. 3–28, 1973.

NORDAHL, S. et al. Pain, tenderness, mandibular mobility, and anterior open bite in relation to radiographic erosions in temporomandibular joint disease. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 55, n. 1, p. 18–22, 1997.

O'BYRNE, E. M. et al. Elevated substance P and accelerated cartilage degradation in rabbit knees injected with interleukin-1 and tumor necrosis factor. **Arthritis and Rheumatism**, v. 33, n. 7, p. 1023–8, 1990.

OGAWA, A. et al. Hard-food mastication suppresses complete Freund's adjuvant-induced nociception. **Neuroscience**, v. 120, n. 4, p. 1081–1092, 2003.

OGBONNA, A. C. et al. Pain-like behaviour and spinal changes in the monosodium iodoacetate model of osteoarthritis in C57Bl/6 mice. **European Journal of Pain**, v. 17, n. 4, p. 514–526, 2013.

OKESON, J. P.; DE LEEUW, R. Differential Diagnosis of Temporomandibular Disorders and Other Orofacial Pain Disorders. **Dental Clinics of North America**, v. 55, n. 1, p. 105–120, 2011.

OLIVEIRA, M. C. G. et al. Evidence for the involvement of endogenous ATP and P2X receptors in TMJ pain. **European Journal of Pain**, v. 9, p. 87–93, 2005.

OOKUMA, K.; SAKATA, T.; FUJIMOTO, K. Evidence for feeding elicited through antihistaminergic effects of tricyclic antidepressants in the rat hypothalamus. **Psychopharmacology**, v. 101, n. 4, p. 481–485, 1990.

ORSET, E.; CHAFFANJON, P.; BETTEGA, G. Temporomandibular joint model: anatomic and radiologic comparison between rat and human. **Surgical and Radiologic Anatomy**, v. 36, p. 163–166, 2013.

OSSOVSKAYA, V. S.; BUNNETT, N. W. Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. **Physiological Reviews**, v. 84, p. 579–621, 2004.

PACHALY, J. Terapêutica por Extrapolação Alométrica. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. (Eds.). . **Tratado de Animais Selvagens – Medicina Veterinária**. 1^a. ed. São Paulo: Roca, 2006. p. 1215–1223.

PASSIK, S. D. Responding rationally to recent report of abuse/diversion of Oxycontin. **Journal of Pain and Symptom Management**, v. 21, n. 5, p. 359–360, 2001.

PAXINOS, G. **The rat nervous system**. 2^a ed. San Diego: Academic Press, 1994. 1136 p.

PECIÑA, S.; BERRIDGE, K. C. Opioid site in nucleus accumbens shell mediates eating and hedonic “liking” for food: Map based on microinjection Fos plumes. **Brain Research**, v. 863, p. 71–86, 2000.

PELISSIER, T.; PAJOT, J.; DALLEL, R. The orofacial capsaicin test in rats: Effects of different capsaicin concentrations and morphine. **Pain**, v. 96, p. 81–87, 2002.

PIETTE, E. Anatomy of the human temporomandibular joint. An updated comprehensive review. **Acta Stomatologica Belgica**, v. 90, n. 2, p. 103–127, 1993.

PLESH, O. et al. Amitriptyline treatment of chronic pain in patients with temporomandibular disorders. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 27, p. 834–841, 2000.

POIGNONEC, S. et al. The temporomandibular joint: anatomy, physiology, clinical review. **Annales de Radiologie**, v. 33, n. 7-8, p. 363–371, 1990.

POMONIS, J. D. et al. Development and pharmacological characterization of a rat model of osteoarthritis pain. **Pain**, v. 114, p. 339–346, 2005.

PRECHTL, J. C.; POWLEY, T. L. Organization and distribution of the rat subdiaphragmatic vagus and associated paraganglia. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 235, p. 182–195, 1985.

PRECHTL, J. C.; POWLEY, T. L. The fiber composition of the abdominal vagus of the rat. **Anatomy and Embryology**, v. 181, p. 101–115, 1990.

PULICHINO, A.-M. et al. Prostacyclin antagonism reduces pain and inflammation in rodent models of hyperalgesia and chronic arthritis. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 319, n. 3, p. 1043–1050, 2006.

RACHINGER-ADAM, B.; CONZEN, P.; AZAD, S. C. Pharmacology of peripheral opioid receptors. **Current Opinion in Anaesthesiology**, v. 24, p. 408–413, 2011.

RAHMAN, W. et al. Descending serotonergic facilitation and the antinociceptive effects of pregabalin in a rat model of osteoarthritic pain. **Molecular Pain**, v. 5, p. 45, 2009.

RANDICH, A.; GEBHART, G. F. Vagal afferent modulation of nociception. **Brain Research Reviews**, v. 17, p. 77–99, 1992.

RANDO, C.; WALDRON, T. TMJ osteoarthritis: A new approach to diagnosis. **American Journal of Physical Anthropology**, v. 148, p. 45–53, 2012.

RANG, H. P. et al. **Rang & Dale: farmacologia**. 7^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. 768 p.

RASHID, M. H. et al. Pharmacological validation of early and late phase of rat mono-iodoacetate model using the Tekscan system. **European Journal of Pain**, v. 17, n. 2, p. 210–222, 2013.

REN, K.; RANDICH, A.; GEBHART, G. F. Vagal afferent modulation of a nociceptive reflex in rats: involvement of spinal opioid and monoamine receptors. **Brain Research**, v. 446, p. 285–294, 1988.

RIFAI, K. et al. Occlusion of dentinal tubules and selective block of pulp innervation prevent the nociceptive behaviour induced in rats by intradental application of irritants. **Archives of Oral Biology**, v. 49, p. 457–468, 2004.

RIZZATTI-BARBOSA, C. M. et al. Clinical evaluation of amitriptyline for the control of chronic pain caused by temporomandibular joint disorders. **Cranio : The Journal of Craniomandibular Practice**, v. 21, n. 3, p. 221–225, 2003.

RODRIGUES, L. L. F. R. et al. Peripheral Sympathetic Component of the Temporomandibular Joint Inflammatory Pain in Rats. **Journal of Pain**, v. 7, n. 12, p. 929–936, 2006.

RODRIGUES, L. L. F. R. et al. Peripheral Sympathetic Component of the Temporomandibular Joint Inflammatory Pain in Rats. **Journal of Pain**, v. 7, n. 12, p. 929–936, 2006.

ROVERONI, R. C. et al. Development of a behavioral model of TMJ pain in rats: The TMJ formalin test. **Pain**, v. 94, p. 185–191, 2001.

SANO, T. et al. Osseous Abnormalities Related to the Temporomandibular Joint. **Seminars in Ultrasound, CT and MRI**, v. 28, p. 213–221, 2007.

SANT'ANA, F. L. Mecanismo antiartrítico da tripsina administrada por via oral. 2013. 98 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Departamento de Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2013.

SARZI-PUTTINI, P. et al. Osteoarthritis: An overview of the disease and its treatment strategies. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 35, n. 1, p. 1–10, 2005.

SAWYNOK, J. Topical and peripherally acting analgesics. **Pharmacological Reviews**, v. 55, n. 1, p. 1–20, 2003.

SAWYNOK, J.; ESSER, M. J.; REID, A. R. Antidepressants as analgesics: an overview of central and peripheral mechanisms of action. **Journal of Psychiatry & Neuroscience**, v. 26, n. 1, p. 21–29, 2001.

SAWYNOK, J.; REID, A. R.; ESSER, M. J. Peripheral antinociceptive action of amitriptyline in the rat formalin test: Involvement of adenosine. **Pain**, v. 80, p. 45–55, 1999.

SAXENA, A. K.; RAMACHANDRAN, R. Cyclooxygenase - 2 Inhibitors in Postoperative Pain and Chronic Pain Management : Current Opinions and Future Perspectives. **Archives of Internal Medicine**, v. 49, p. 170–179, 2005.

SCHÜTZ, T. C. B.; ANDERSEN, M. L.; TUFİK, S. Effects of COX-2 inhibitor in temporomandibular joint acute inflammation. **Journal of Dental Research**, v. 86, p. 475–479, 2007.

SCHÜTZ, T. C. B.; ANDERSEN, M. L.; TUFİK, S. Sleep alterations in an experimental orofacial pain model in rats. **Brain Research**, v. 993, p. 164–171, 2003.

SCRIVANI, S. J.; KEITH, D. A.; KABAN, L. B. Temporomandibular disorders. **New England Journal of Medicine**, v. 359, p. 2693–2705, 2008.

SESSLE, B. J. Acute and chronic craniofacial pain: brainstem mechanisms of nociceptive transmission and neuroplasticity, and their clinical correlates. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v. 11, p. 57–91, 2000.

SESSLE, B. J. Mechanisms of oral somatosensory and motor functions and their clinical correlates. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 33, p. 243–261, 2006.

SESSLE, B. J. The neural basis of temporomandibular joint and masticatory muscle pain. **Journal of Orofacial Pain**, v. 13, n. 4, p. 238–45, 1999.

SHAEFER, J. R. et al. Pain and temporomandibular disorders. A pharmaco-gender dilemma. **Dental Clinics of North America**, v. 57, p. 233–262, 2013.

SHAFFER, S. M. et al. Temporomandibular disorders. Part 1: anatomy and examination/diagnosis. **The Journal of Manual & Manipulative Therapy**, v. 22, n. 1, p. 2–12, 2014.

SHANE ANDERSON, A.; LOESER, R. F. Why is osteoarthritis an age-related disease? **Best Practice and Research: Clinical Rheumatology**, v. 24, n. 1, p. 15–26, 2010.

SHARAV, Y. et al. The analgesic effect of amitriptyline on chronic facial pain. **Pain**, v. 31, p. 199–209, 1987.

SHEN, H. et al. Analgesic action of acetaminophen in symptomatic osteoarthritis of the knee. **Rheumatology**, v. 45, n. 6, p. 765–770, 2006.

SHINODA, M. et al. Nerve terminals extend into the temporomandibular joint of adjuvant arthritic rats. **European Journal of Pain**, v. 7, p. 493–505, 2003.

SIEGLE, I. et al. Expression of cyclooxygenase 1 and cyclooxygenase 2 in human synovial tissue: differential elevation of cyclooxygenase 2 in inflammatory joint diseases. **Arthritis and Rheumatism**, v. 41, n. 1, p. 122–9, 1998.

SILVA, A. et al. Sex differences in sleep pattern of rats in an experimental model of osteoarthritis. **European Journal of Pain**, v. 15, n. 6, p. 545–553, 2011.

SILVA, A.; ANDERSEN, M. L.; TUFIK, S. Sleep pattern in an experimental model of osteoarthritis. **Pain**, v. 140, n. 3, p. 446–455, 2008.

SINGER, E.; DIONNE, R. A controlled evaluation of ibuprofen and diazepam for chronic orofacial muscle pain. **Journal of Orofacial Pain**, v. 11, n. 2, p. 139–46, 1997.

SOLOMON, S. D. et al. Cardiovascular risk associated with celecoxib in a clinical trial for colorectal adenoma prevention. **The New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 11, p. 1071–80, 2005.

STEGENGA, B. et al. Short-term outcome of arthroscopic surgery of temporomandibular joint osteoarthritis and internal derangement: A randomized controlled clinical trial. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 31, n. 1, p. 3–14, 1993.

STEINHOFF, M. et al. Agonists of proteinase-activated receptor 2 induce inflammation by a neurogenic mechanism. **Nature medicine**, v. 6, n. 2, p. 151–158, 2000.

STRASSLE, B. W. et al. Inhibition of osteoclasts prevents cartilage loss and pain in a rat model of degenerative joint disease. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 18, n. 10, p. 1319–1328, 2010.

SWIFT, J. Q. et al. Effect of intra-articular versus systemic anti-inflammatory drugs in a rabbit model of temporomandibular joint inflammation. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 56, p. 1288–1295, 1998.

TA, L. E.; DIONNE, R. A. Treatment of painful temporomandibular joints with a cyclooxygenase-2 inhibitor: A randomized placebo-controlled comparison of celecoxib to naproxen. **Pain**, v. 111, p. 13–21, 2004.

TAKAHASHI, T. et al. Proinflammatory cytokines detectable in synovial fluids from patients with temporomandibular disorders. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, v. 85, p. 135–141, 1998.

TAKEDA, M. et al. Volume expansion suppresses the tooth-pulp evoked jaw-opening reflex related activity of trigeminal neurons in rats. **Brain Research Bulletin**, v. 58, n. 1, p. 83–89, 2002.

TAKEUCHI, Y. et al. Effects of experimentally induced inflammation on temporomandibular joint nociceptors in rats. **Neuroscience Letters**, v. 354, p. 172–174, 2004.

TAKEUCHI, Y.; ISHII, N.; TODA, K. An in vitro temporomandibular joint-nerve preparation for pain study in rats. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 109, p. 123–128, 2001.

TAKEUCHI, Y.; TODA, K. Subtypes of nociceptive units in the rat temporomandibular joint. **Brain Research Bulletin**, v. 61, p. 603–608, 2003.

TANAKA, A. et al. Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 in synovial fluid of the temporomandibular joint accompanied by anterior disc displacement. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 30, p. 59–64, 2001.

TANAKA, E.; DETAMORE, M. S.; MERCURI, L. G. Degenerative disorders of the temporomandibular joint: etiology, diagnosis, and treatment. **Journal of Dental Research**, v. 87, p. 296–307, 2008.

TANIMOTO, T.; TAKEDA, M.; MATSUMOTO, S. Suppressive effect of vagal afferents on cervical dorsal horn neurons responding to tooth pulp electrical stimulation in the rat. **Experimental Brain Research**, v. 145, p. 468–479, 2002.

TAVARES, I.; LIMA, D. Descending projections from the caudal medulla oblongata to the superficial or deep dorsal horn of the rat spinal cord. **Experimental Brain Research**, v. 99, p. 455–463, 1994.

TAVARES, I.; LIMA, D. The caudal ventrolateral medulla as an important inhibitory modulator of pain transmission in the spinal cord. **The Journal of Pain**, v. 3, n. 5, p. 337–346, 2002.

TAVARES, I.; LIMA, D.; COIMBRA, A. The ventrolateral medulla of the rat is connected with the spinal cord dorsal horn by an indirect

descending pathway relayed in the A5 noradrenergic cell group. **Journal of Comparative Neurology**, v. 374, p. 84–95, 1996.

TEGEDER, I. et al. Effects of selective COX-1 and -2 inhibition on formalin-evoked nociceptive behaviour and prostaglandin E2 release in the spinal cord. **Journal of Neurochemistry**, v. 79, p. 777–786, 2001.

TEMPLE, A. R. et al. Multicenter, randomized, double-blind, active-controlled, parallel-group trial of the long-term (6-12 months) safety of acetaminophen in adult patients with osteoarthritis. **Clinical Therapeutics**, v. 28, n. 2, p. 222–235, 2006.

TERNER, J. M.; LOMAS, L. M.; PICKER, M. J. Influence of estrous cycle and gonadal hormone depletion on nociception and opioid antinociception in female rats of four strains. **The Journal of Pain : Official Journal of The American Pain Society**, v. 6, n. 6, p. 372–83, 2005.

THORNE, C. et al. A randomized, double-blind, crossover comparison of the efficacy and safety of oral controlled-release tramadol and placebo in patients with painful osteoarthritis. **Pain Research & Management**, v. 13, n. 2, p. 93–102, 2008.

THUT, P. D. et al. An operant conditioning model to assess changes in feeding behavior associated with temporomandibular joint inflammation in the rat. **Journal of Orofacial Pain**, v. 21, p. 7–18, 2007.

TING, E. et al. Indirect mechanism of histamine-induced nociception in temporomandibular joint of rats. **Life Sciences**, v. 81, p. 765–771, 2007.

TOCCI, M. J. Structure and function of interleukin-1 beta converting enzyme. **Vitamins and Hormones**, v. 53, p. 27–63, 1997.

TOMAS, X. et al. MR imaging of temporomandibular joint dysfunction: a pictorial review. **Radiographics**, v. 26, p. 765–781, 2006.

TORRES-CHÁVEZ, K. E. et al. Effect of gonadal steroid hormones on formalin-induced temporomandibular joint inflammation. **European Journal of Pain**, v. 16, p. 204–16, 2012.

TOWHEED, T. E. et al. Acetaminophen for osteoarthritis. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 1, p. 1-70, 2006.

UDDMAN, R. et al. Distribution and origin of nerve fibers in the rat temporomandibular joint capsule. **Anatomy and Embryology**, v. 197, p. 273–282, 1998.

VAN DER KRAAN, P. M. et al. Development of osteoarthritic lesions in mice by “metabolic” and “mechanical” alterations in the knee joints. **The American Journal of Pathology**, v. 135, n. 6, p. 1001–1014, 1989.

VAN DER ZANDEN, E. P.; BOECKXSTAENS, G. E.; DE JONGE, W. J. The vagus nerve as a modulator of intestinal inflammation. **Neurogastroenterology and Motility**, v. 21, p. 6–17, 2009.

VANEGAS, H.; SCHAIBLE, H. G. Prostaglandins and cyclooxygenases [correction of cycloxygenases] in the spinal cord. **Progress in Neurobiology**, v. 64, p. 327–363, 2001.

VERGNOLLE, N. et al. Protease-activated receptors in inflammation, neuronal signaling and pain. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 22, n. 3, p. 146–152, 2001.

VERGNOLLE, N. Modulation of visceral pain and inflammation by protease-activated receptors. **British Journal of Pharmacology**, v. 141, p. 1264–1274, 2004.

VERNAL, R. et al. Expression of proinflammatory cytokines in osteoarthritis of the temporomandibular joint. **Archives of Oral Biology**, v. 53, p. 910–915, 2008.

VONSY, J. L.; GHANDEHARI, J.; DICKENSON, A. H. Differential analgesic effects of morphine and gabapentin on behavioural measures of pain

and disability in a model of osteoarthritis pain in rats. **European Journal of Pain**, v. 13, n. 8, p. 786–793, 2009.

VOS, L. M. et al. Alteration of cartilage degeneration and inflammation markers in temporomandibular joint osteoarthritis occurs proportionally. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 71, n. 10, p. 1659–1664, 2013.

VOS, L. M. et al. Inflammation is more distinct in temporomandibular joint osteoarthritis compared to the knee joint. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 72, n. 1, p. 35–40, 2014.

WANDEL, S. et al. Effects of glucosamine, chondroitin, or placebo in patients with osteoarthritis of hip or knee: network meta-analysis. **British Medical Journal**, v. 341, p. 1–9, 2010.

WANG, S. et al. A Functional Relationship Between Trigeminal Astroglial Activation and NR1 Expression in a Rat Model of Temporomandibular Joint Inflammation. **Pain Medicine (United States)**, v. 13, p. 1590–1600, 2012.

WANG, X. D. et al. Estrogen aggravates iodoacetate-induced temporomandibular joint osteoarthritis. **Journal of Dental Research**, v. 92, p. 918–24, 2013.

WANG, X. D. et al. Progression of Cartilage Degradation, Bone Resorption and Pain in Rat Temporomandibular Joint Osteoarthritis Induced by Injection of Iodoacetate. **PlosOne**, v. 7, n. 9, p. 1–12, 2012.

WATKINS, L. R. et al. Characterization of cytokine-induced hyperalgesia. **Brain Research**, v. 654, n. 1, p. 15–26, 1994.

WENNEBERG, B.; KOPP, S.; GRÖNDAHL, H. G. Long-term effect of intra-articular injections of a glucocorticosteroid into the TMJ: a clinical and radiographic 8-year follow-up. **Journal of Craniomandibular Disorders**, v. 5, n. 1, p. 11–8, 1991.

WHO, T. R. S. The burden of musculoskeletal conditions at the start of the new millennium. **World Health Organization Technical Report Series**, v. 919, p. 1-218, 2003.

WOOLF, C. J. Central Sensitization: Implications for the diagnosis and treatment of pain. **Pain**, v. 152, n. 3, p. 1–31, 2012.

WOOLF, C. J.; SALTER, M. W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. **Science**, v. 288, p. 1765–1768, 2000.

WU, C. W.; KALUNIAN, K. C. New Developments in Osteoarthritis. **Clinics in Geriatric Medicine**, v. 21, p. 586–601, 2005.

WU, Y.-W. et al. 17-Beta-estradiol enhanced allodynia of inflammatory temporomandibular joint through upregulation of hippocampal TRPV1 in ovariectomized rats. **The Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 26, p. 8710–8719, 2010.

XU, W. et al. Activation of voltage-gated KCNQ/Kv7 channels by anticonvulsant retigabine attenuates mechanical allodynia of inflammatory temporomandibular joint in rats. **Molecular Pain**, v. 6, n. 1, p. 49, 2010.

YAMAZAKI, Y. et al. Modulation of paratrigeminal nociceptive neurons following temporomandibular joint inflammation in rats. **Experimental Neurology**, v. 214, n. 2, p. 209–218, 2008.

YOSHIDA, K. et al. Aggrecanase analysis of synovial fluid of temporomandibular joint disorders. **Oral Diseases**, v. 11, p. 299–302, 2005.

YOUNGER, J. W. et al. Chronic myofascial temporomandibular pain is associated with neural abnormalities in the trigeminal and limbic systems. **Pain**, v. 149, n. 2, p. 222–228, 2010.

ZHAO, P.; METCALF, M.; BUNNETT, N. W. Biased signaling of protease-activated receptors. **Frontiers in Endocrinology**, v. 5, n. 67, p. 1–16, 2014.