

Marcelo Macari

Cirurgião-Dentista

**EFEITO DO ÓXIDO NÍTRICO PERIFÉRICO NA
RESPOSTA NOCICEPTIVA INDUZIDA PELA
FORMALINA NA ATM DE RATOS.**

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba da
Universidade Estadual de Campinas,
para obtenção do Título de Mestre em
Odontologia, com formação em
Fisiologia Oral.

Piracicaba

2002

ⁱUNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

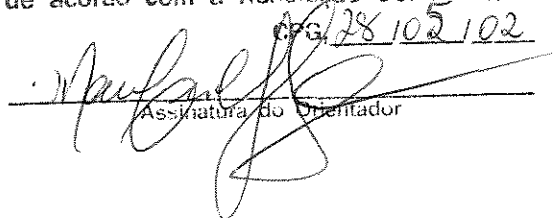
UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO DE

Marcelo Macari

Cirurgião-Dentista

**EFEITO DO ÓXIDO NÍTRICO PERIFÉRICO NA
RESPOSTA NOCICEPTIVA INDUZIDA PELA
FORMALINA NA ATM DE RATOS.**

Este exemplar foi devidamente corrigido,
de acordo com a Resolução CCPG-036/83

CPG 28/05/02

Assinatura do Orientador

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba da
Universidade Estadual de
Campinas, para obtenção do Título
de Mestre em Odontologia, com
formação em Fisiologia Oral

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Herrera Tambeli

Co-Orientadora: Profa. Dra. Maria Cecília F. A. Veiga

Banca Examinadora: Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva

Prof. Dr. Eduardo Dias de Andrade

**Piracicaba
2002**

Ficha Catalográfica

M118e Macari, Marcelo.
Efeito do óxido nítrico periférico na resposta nociceptiva induzida pela formalina na ATM de ratos. / Marcelo Macari. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2002.
ix, 95f. : il.

Orientadores : Prof^a Dr^a Cláudia Herrera Tambeli,
Prof^a Dr^a Maria Cecília F. A. Veiga.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Articulação temporomandibular. 2. Dor. I. Tambeli, Cláudia Herrera. II. Veiga, Maria Cecília F. A. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

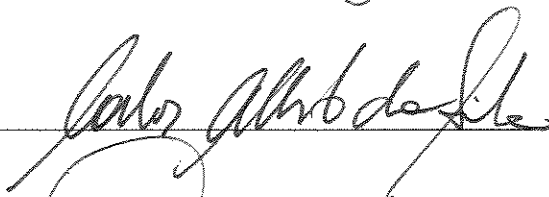
Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marilene Girello CRB/8-6159, da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de MESTRADO, em sessão pública realizada em 27 de Março de 2002, considerou o candidato MARCELO MACARI aprovado.

1. Profa. Dra. MARIA CECILIA FERRAZ ARRUDA VEIGA



2. Prof. Dr. CARLOS ALBERTO DA SILVA



3. Prof. Dr. EDUARDO DIAS DE ANDRADE



Dedico este trabalho

à minha **Família**; meu alicerce e abrigo. Motivo e razão de tudo o que sou e serei.

à minha metade, **Renata**, por ter sempre estado ao meu lado, e do meu lado.

AGRADECIMENTOS

À **Profa. Dra. Cláudia Herrera Tambeli**, pela orientação, confiança e incentivo no desenvolvimento deste trabalho.

À **Profa. Dra. Maria Cecília Ferraz de Arruda Veiga**, pela co-orientação; por saber aplaudir os acertos e ensinar a consertar os erros.

Ao **Prof. Dr. Carlos Amílcar Parada**, pelas sugestões no projeto e execução do trabalho.

À **Profa. Dra. Fernanda Klein Marcondes, Carlos Alberto A. Feliciano, Shirley R. S. Moreto, Daniele A. Antonio**, do Departamento de Ciências Fisiológicas, pela ajuda e pelo convívio.

Às **Profas. Dra. Maria Beatriz Duarte Gavião, Dra. Cecília Gatti Guirado e Dra. Silvana Pereira Barros**, pelas sugestões e colaboração na versão preliminar deste trabalho.

Aos colegas de curso - **Alexandre, Ana Paula, Daniela, Eduardo, Franco, Leonardo** e especialmente ao **Dany**, que foi praticamente adotado pela minha família - valeu ter tido a chance de aprender além da Odontologia; por conhecer mais sobre a amizade e da sua importância no caminho que se faz. Que seja para sempre!

Aos alunos de Iniciação Científica do Departamento de Ciências Fisiológicas; **Josiane Laurindo de Paula**, pelos

incontáveis finais de semana trabalhando (e rindo muito), pelo incentivo e amizade; **Elizabeth Ting**, por estar sempre disposta a ajudar, e pela ajuda e **Filipe M. dos Santos**, pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos do curso de Especialização em Prótese Dental; **Cleison**, e **Sandra**, especialmente **Ana Lúcia** e **Maria Aparecida (Dinha)** pelo apoio e torcida, quando o mestrado ainda era apenas um sonho e por terem aceitado tantos “nãos” nos finais de semana.

Ao amigo **Rogério**, pela partilha. Pelos momentos de “desestresse”; filosofia, bom papo e boa música.

Ao amigo e padrinho **Dr. Pedro Arno C. Barbosa**, pela amizade e incentivo.

Aos meus professores da Graduação; **Deodato Otávio de Moraes Filho**, **Eduardo Celso Penna Boock**, **Márcia Brunelli** e **Ricardo de Oliveira Bozzo**, por serem meu espelho, me ensinarem o que eu quero ser como docente. Por me mostrarem que é possível sonhar; que idealismo, amizade e perseverança são irmãos. É isso o que nos impulsiona.

(“Para ensinar, há uma formalidade a cumprir: saber.” – Eça de Queiroz)

À **Faculdade de Odontologia de Piracicaba FOP/UNICAMP**, por ter permitido a realização deste trabalho e também aos seus **funcionários**, que direta ou indiretamente, participaram com o seu trabalho.

À **CAPES**, pelo apoio financeiro nesta pesquisa.

“Para ser grande, sê inteiro; nada teu exagera ou exclui. Sê todas as coisas. Põe quanto és no mínimo que fazes. Assim, em cada lago a lua toda brilha. Porque alta vive.”

Fernando Pessoa

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas	1
Lista de Figuras	3
Lista de Tabelas	4
Resumo	5
Abstract	7
1. Introdução	9
2. Revisão de Literatura	12
3. Material e Métodos	40
4. Resultados	48
5. Discussão	60
6. Conclusão	69
Referências Bibliográficas	70
Anexos	
Apêndice	

Lista de abreviaturas:

Ach: acetilcolina

AE: Azul de Evans

AINES: Anti-inflamatórios não esteroidais

ATM: Articulação temporomandibular

CO: Comportamento de coçar a região orofacial

ct: contralateral

D-NMMA: N^G-monomethyl-D-arginina

DTM: Disfunção temporomandibular

eNOS: Óxido Nítrico Sintase endotelial

GMPc: Guanosina-monofosfato cíclico

iNOS: Óxido Nítrico Sintase induzida

ip: ipsilateral

LC: Comportamento de levantar a cabeça

L-NMMA: N^G-monomethyl-L-arginina (inibidor da NOS)

NMDA: N-metil-D-aspartato

N: Nitrogênio

nNOS: Óxido Nítrico Sintase neuronal

NO: Óxido nítrico

NOS: Óxido nítrico sintase

NTET: Núcleo do Trato Espinhal do Trigêmeo

O: Oxigênio

PGE2: Prostaglandina E2

s: segundos

SIN-1: 3-Morpholinosydnonimine (doador de NO)

SNAP: S-nitroso-N-acetylpenicillamine (doador de NO)

SP: Substância P

TNL: Terminações nervosas livres

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Efeito da co-administração do L-NMMA (900µg) e formalina (3%) na região da ATM sobre o comportamento nociceptivo.....	50
FIGURA 2 – Efeito da administração de L-NMMA e D-NMMA na ATM ipsilateral à aplicação de formalina (0,5%) e de L-NMMA na região da ATM contralateral sobre o comportamento nociceptivo.....	51
FIGURA 3 –Efeito da co-administração de diferentes concentrações de L-NMMA e formalina (0,5%) na região da ATM, sobre o comportamento nociceptivo.....	52
FIGURA 4 –Efeito da administração de SNAP na ATM ipsilateral à aplicação de formalina (3%) e na região da ATM contralateral sobre o comportamento nociceptivo.....	54
FIGURA 5 – Efeito da co-administração de diferentes concentrações de SNAP e formalina (3%) na região da ATM sobre o comportamento nociceptivo.....	56
FIGURA 6 – Efeito da co-administração de SIN-1 na ATM ipsilateral à aplicação de formalina (3%) e na região da ATM contralateral, sobre o comportamento nociceptivo.....	57
FIGURA 7 – Efeito da co-administração de diferentes concentrações de SIN-1 e formalina (3%) na região da ATM sobre o comportamento nociceptivo..	59

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Efeito da co-administração de L-NMMA (900ug) e formalina (3%) na região da ATM sobre o comportamento nociceptivo.....	49
TABELA 2 –Efeito da administração de L-NMMA e D-NMMA na ATM ipsilateral sobre o comportamento nociceptivo.....	50
TABELA 3 –Efeito da co-administração de diferentes concentrações de L-NMMA e formalina (0,5%) na região da ATM sobre o comportamento nociceptivo.....	52
TABELA 4 –Efeito da administração de SNAP na ATM ipsilateral à aplicação de formalina (3%) e na região da ATM contralateral sobre o comportamento nociceptivo.....	53
TABELA 5 Efeito da co-administração de diferentes concentrações de SNAP e formalina (3%) na região da ATM sobre o comportamento nociceptivo.....	55
TABELA 6 –Efeito da administração de SIN-1 na ATM ipsilateral à aplicação de formalina (3%) na região da ATM contralateral sobre o comportamento nociceptivo.....	57
TABELA 7 –Efeito da co-administração de diferentes concentrações de SIN-1 e formalina (3%) na região da ATM sobre o comportamento nociceptivo.....	58

RESUMO:

As condições dolorosas temporomandibulares têm sido relacionadas ao Óxido Nítrico(NO), entretanto, seu envolvimento nessas condições ainda é pouco conhecido. O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito do NO periférico num modelo comportamental de dor, utilizando o teste da formalina na ATM. Para isso, solução salina (NaCl 0,9%) ou o inibidor da óxido nítrico sintase, **L-NMMA** (N^G-monomethyl-L-arginina) e doadores periféricos de NO; **SNAP** (S-Nitroso-N-acetylpenicillamine) e **SIN-1** (3-Morpholinosydnonimine); foram co-administrados com formalina 3% na região da ATM de ratos, em diferentes concentrações, ou seja, L-NMMA na concentração de 900µg e SIN-1 ou SNAP nas concentrações de 50, 200, 600 ou 1200µg. Numa segunda etapa, o L-NMMA (150, 450 e 900µg) e seu isômero inativo **D-NMMA** (N^G-monomethyl-D-arginina) (900µg) foram co-administrados com a formalina (0,5%,). Com o objetivo de investigar um possível efeito sistêmico, o L-NMMA, o SNAP e o SIN-1 foram administrados na máxima concentração citada anteriormente, na região da ATM contralateral à da administração de formalina (1,5%). Após os diferentes tratamentos farmacológicos, as respostas nociceptivas sinalizadas nos animais, caracterizadas pelo ato de coçar a região orofacial (CO) e levantar rapidamente a cabeça (LC) foram quantificadas por 45 min. Os resultados obtidos demonstraram que os doadores de NO; **SNAP** e **SIN-1**, antagonizam a hiperalgesia causada pela

formalina, sugerindo que o NO exógeno tem efeito periférico antinociceptivo na dor induzida pela formalina e que o L-NMMA aumenta a sensibilidade dolorosa, evidenciando o envolvimento (efeito antinociceptivo) do NO endógeno periférico no teste da formalina na ATM de ratos.

ABSTRACT

Although the TMJ pain conditions are associated to a very high level of an intracellular messenger, the nitric oxide, in the TMJ sinovial fluid (TAKAHASHI et al, 1996), the role of the endogenous peripheral nitric oxide in the pain conditions is not very clear. Considering the recent development of a behavioral model in our laboratory to stud the TMJ pain conditions, the objective of this study was verifying in this model, the role of peripheral endogenous nitric oxide. Firstly, aqueous solution of NaCl 0,9% or the Nitric Oxide Sinthase (NOS) inhibitor, the L-NMMA and the peripheral NO donors SIN-1 or SNAP was co-administered with aqueous solution of Formaldehyde (3%) in the TMJ region of rats in diferents concentrations. L-NMMA was administered in 50, 150, 450 or 900µg and SNAP or SIN-1 were administered 50, 200, 600 or 1200µg. Secondly, L-NMMA (150, 450, 900 µg) and its inactive isomer D-NMMA (900 µg) were co-administered with formaline (0,5%). To investigate a possible systemic effect, L-NMMA, SNAP and SIN-1 were administrated in the maximum concentration described above, in the TMJ contralateral region to the formaline administration (1,5%). After different pharmacological treatment, the nociceptives responses characterized by rubbing the orofacial region and flinching the head quickly were quantified for 45 minutes. The results of this work showed that the NO donnors, SNAP and

SIN-1, antagonize the formaline hyperalgesia, it suggests that the exogenous NO has an antinociceptive peripheral effect, induced by formalin and that L-NMMA increases the nociceptive sensitivity, evidencing the peripheral exogenous NO involvement in the formalin test accomplished in TMJ of rats. To verify the specificity of effects unchained by L-NMMA, its inactive isomer D-NMMA (900µg) was co-administered with formaldehyde solution, like previously described. To investigate a possible systemic effect of L-NMMA, it was administered in the maximum concentration utilized in these study, in the TMJ region to the contralateral administration of formaldehyde solution (1,5%). The results were submitted to ANOVA and Tukey tests ($p < 0,05$).

1. INTRODUÇÃO

Nenhuma outra experiência humana é tão repleta de significados quanto a dor. A idéia de que dor é simplesmente o resultado de uma condição física interna é relativamente recente. Nas sociedades antigas, a dor sem causa aparente, como traumatismos, era atribuída à invasão do corpo por maus espíritos e por punição.

Nas sociedades primitivas praticava-se o auto-flagelo, na crença de que a dor seria recompensada por uma boa colheita ou simplesmente para agradar aos deuses. Para muitas filosofias e culturas, a dor teria origem externa tal como “a vontade de Deus”. Esta concepção de origem externa da dor, fez com que ela tivesse significados tanto no contexto social quanto moral.

A história bíblica do Gênesis descreve a introdução da dor e sofrimento na experiência humana como punição divina para a transgressão, ainda na Bíblia, pode-se ler em Isaías (26,17): “... porque o teu castigo os atingiu... se contorce e, nas suas dores, dá gritos...”. No Egito antigo e na Babilônia, a dor era considerada punição dos deuses, e acreditava-se que o coração e os vasos sanguíneos eram seus mensageiros.

Por toda a história textos literários mostram as representações de dor baseadas em doutrinas de punição. No centro do Inferno de Dante, por exemplo, a terrível figura de Lúcifer atormenta três homens que traíram seus senhores: Cassius, Brutus e Judas Iscariot. O sacrifício de Jesus no calvário, a fome ascética de Sidhartha, o Buda, e as seitas religiosas que pregam o autoflagelo nos dias santos manifestam o uso da dor para purificação, perdendo a transgressão através de ablações dolorosas temporárias.

Somente nos textos literários a associação entre dor, moral e comportamento social das pessoas, é precisa.

Na Índia, a dor foi reconhecida como uma sensação; começava-se, então, a ter uma visão mais abrangente, associando-se aspectos emocionais à dor; enquanto na China, acreditava-se que as doenças e conseqüentemente, a dor, estavam relacionadas ao excesso ou deficiência de certos fluidos endógenos. Na Grécia, entre os séculos V e VI aC., acreditava-se que o estímulo doloroso era conduzido pelo sangue ao coração. Nesta época Aristóteles caracterizou as cinco modalidades sensoriais (visão, olfato, tato, paladar e audição); a partir daí, tinha-se a noção de que existiam vias diferentes para as variadas sensações. Estes conceitos de Aristóteles predominaram até a Idade Média e somente após o Renascimento, foi atribuído ao cérebro e nervos, e não mais ao coração, o processamento da sensação nociceptiva.

Já nos séculos XVI e XVII, Descartes introduziu os conceitos da especificidade das vias nervosas envolvidas na nocicepção que viriam a se firmar completamente no século XIX.

Com o avanço das pesquisas nas últimas décadas, no campo da fisiologia da dor, diversas terapias antiálgicas têm sido propostas. Estas compreendem novos fármacos, meios físicos (TENS – Estimulação Nervosa Transcutânea), bloqueios de vias sensitivas, amputação ou estimulação de sistemas sensoriais.

Dentre os fenômenos dolorosos, os que atingem a região orofacial são de grande incidência e variabilidade.

O NO é um sinalizador intracelular envolvido na transmissão nociceptiva, que tem despertado bastante interesse no meio científico. Suas funções até hoje descobertas são complexas. Essa molécula tem sido encontrada em níveis significativamente elevados no fluido sinovial de ATMs com processo inflamatório instalado, sendo conseqüentemente associada à dor proveniente do complexo orofacial.

O objetivo deste trabalho foi verificar se o NO periférico potencializa (efeito pró-nociceptivo) ou modula (efeito anti-nociceptivo) a resposta comportamental nociceptiva, induzida pela administração de formalina na ATM de ratos, através da co-administração de L-NMMA, um inibidor da Óxido Nítrico Sintase (NOS), e dos doadores de NO (SNAP e SIN-1) com a formalina.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 DOR - CONCEITUAÇÃO

Dor foi conceituada, em 1986, pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) como “uma experiência sensorial e emocional desagradável que é associada a lesões reais ou potenciais, ou descritas em termos de tais lesões. A dor é sempre subjetiva. Cada indivíduo aprende a utilizar este termo através de suas experiências” (MERSK, 1986).

Na evolução embriológica do ser humano, um dos primeiros tecidos a ser formado é a placa neural (entre 16ª e 18ª semana) evoluindo para o tubo neural (21ª semana), que formará posteriormente, a medula. Nesta fase, tem início um esboço primitivo de todo este mecanismo. (SADLER, 1997). A consciência da dor ocorre à medida que o nível de percepção se aprimora, ou seja, quando o córtex cerebral está completo.

É mostrado na literatura que grande parte dos episódios dolorosos são desencadeados por injúria tecidual. A reação natural do organismo ao trauma é protegê-lo localmente impedindo uma destruição tecidual ainda maior e ao mesmo tempo alertar o cérebro do perigo eminente (COOPER, 1990), através da inflamação e da dor, respectivamente.

Embora seja essencial para a preservação da vida, em muitas circunstâncias a dor perde seu caráter protetor e passa a constituir a própria doença (CODERRE et al., 1993).

2.1.1 - DOR OROFACIAL

A dor ocorre usualmente pela ativação de nociceptores específicos, mas, pode também resultar da injúria de fibras sensoriais ou danos ao SNC. (MILLAN, 1999).

O sistema de receptores nociceptivos nos tecidos faciais é representado por um arranjo plexiforme e de terminações livres de fibras nervosas amielínicas. Essas fibras, chamadas terminações nervosas livres (TNL); estão distribuídas pela pele, tecido subcutâneo, fascia, tecido adiposo, camada adventícia dos vasos sanguíneos, periósteo, músculos, cápsula e ligamentos da ATM. Em circunstâncias normais, este sistema está inativo, mas não totalmente. Muitas dessas TNL atuam como nociceptores, respondendo a estímulos nocivos (SESSLE,1995). Sua atividade aferente é acentuada quando são excitadas por aplicação de forças mecânicas, térmicas e elétricas, que possam deformar ou alterar os tecidos que as contém, ou químicas, quando há exposição aos fluidos dos tecidos circunvizinhos ou substâncias irritantes como ácido láctico, bradicinina, histamina, íons potássio e outras substâncias liberadas de tecidos inflamados e metabolicamente anormais.

Além das substâncias mais conhecidas, como ácido láctico, íons potássio, prostaglandinas e bradicinina, outras substâncias como prótons, ATP, citocinas, neurofinas (fatores de crescimento) e o NO, têm sido também, relacionadas à nocicepção (MILAN,1999). Quando esses nociceptores são excitados, enviam informações ao Sistema Nervoso Central (SNC) para que identifique a intensidade, qualidade, localização e duração desse estímulo (SESSLE, 1995).

Os impulsos nervosos gerados são transmitidos por fibras nociceptivas, cujo corpo celular se localiza no gânglio trigeminal. As fibras aferentes que conduzem a informação nociceptiva (fibras C), são fibras de pequeno calibre, amielinizadas, de velocidade de condução de 0,5 a 2 m/s e às fibras A-delta, que são mielinizadas, com velocidade de condução de 5 a 30 m/s (AGHABEIGI, 1992). Essas fibras entram no SNC pela ponte e fazem sinapse com neurônios localizados no núcleo do trato espinhal do trigêmeo (NTET), que é subdividido em subnúcleo oral, subnúcleo interpolar e subnúcleo caudal (SESSLE, 1995) .

O subnúcleo caudal está localizado na parte mais inferior do núcleo do trato espinhal do trigêmeo, estendendo-se até a medula espinhal, onde se funde com o corno dorsal da mesma, e é considerada a principal área de transmissão da informação nociceptiva proveniente da região orofacial (HU et al., 1997). Por apresentar características funcionais e morfológicas similares às dos neurônios do corno dorsal da medula espinhal (DUBNER, 1986), que são

fundamentais na transmissão da informação nociceptiva da região de tronco e membros, o subnúcleo caudal é designado como corno dorsal medular. O subnúcleo caudal possui neurônios nociceptivos (HU, 1990), que podem ser ativados por agentes químicos ou por estímulo elétrico na ATM e em outros tecidos profundos. Os neurônios nociceptivos específicos respondem somente a estímulos nocivos, e os convergentes ou multirreceptivos, respondem tanto a estímulos mecânicos, como a estímulos nocivos (YU et al., 1993).

Os neurônios nociceptivos do subnúcleo caudal parecem apresentar uma extensiva convergência de fibras nervosas aferentes, sendo elas provenientes da pele e da mucosa; ou seja, de tecidos cutâneos, e da ATM, músculos mastigatórios, língua e da dura-máter, que são tecidos profundos. Essa convergência de fibras da ATM e músculos mastigatórios para os neurônios nociceptivos cutâneos, pelo menos em parte, pode explicar a dificuldade na localização de estímulos nocivos profundos e a dor referida freqüentemente associada a esses tecidos (HU et al., 1994; TSAI et al., 1999).

Apesar de o subnúcleo caudal apresentar um papel crucial na transmissão da informação nociceptiva dos tecidos craniofaciais profundos, ele está criticamente envolvido na expressão de respostas reflexas nociceptivas. O aumento da atividade eletromiográfica nos músculos que participam da abertura e fechamento bucal, por estímulo doloroso na região da ATM, sugere que essas informações nociceptivas possam ativar neurônios no subnúcleo caudal que, por conexões com os centros reflexos do tronco cerebral

desencadeia a ativação tanto dos músculos agonistas e antagonistas, podendo limitar os movimentos mandibulares em condições patofisiológicas (SESSLE, 1995; HU et al., 1997).

Além do subnúcleo caudal, o subnúcleo interpolar também parece estar envolvido na expressão da informação nociceptiva proveniente da região orofacial. Sabe-se que aminoácidos excitatórios como glutamato e aspartato, participam do processamento da informação nociceptiva no sistema nervoso central e subnúcleo caudal. O subnúcleo oral, localizado na parte mais rostral do NTET, também representa um elemento importante no processamento da dor orofacial, e pode estar especialmente envolvido nos mecanismos nociceptivos intra-orais e periorais (SESSLE, 1995). Apesar de ser desprovido de substância gelatinosa, o subnúcleo oral contém neurônios que exibem o fenômeno “win-up”, semelhante ao fenômeno que ocorre no corno dorsal da medula espinhal (PARADA et al., 1997). O fenômeno do “wind-up” é uma propriedade dos neurônios convergentes, consiste no aumento gradual nas respostas da fibra C, provocado pela estimulação elétrica repetitiva de baixa frequência e alta intensidade.

Estudos eletrofisiológicos têm demonstrado que os subnúcleos caudal e oral parecem exercer funções distintas no processamento nociceptivo no complexo trigeminal do tronco cerebral. HUOPANIEMI et al., (1992) compararam características eletrofisiológicas dos neurônios do subnúcleo oral com os dos subnúcleos caudal e interpolar. Para isso, analisaram a resposta à

estimulação elétrica em dentes de gatos submetidos a anestesia, sobre a atividade neuronal do subnúcleo oral; concluíram que a maioria dos neurônios sensitivos do subnúcleo oral apresentavam limiares de resposta menores e um período de latência mais curto que os dos subnúcleos caudal e interpolar. RABOISSON et al., (1995) mostraram que o subnúcleo caudal parece estar mais envolvido no processo de dor inflamatória tônica e/ou nos estados hiperalgésicos centrais do que o subnúcleo oral.

Sabe-se que após a estimulação nociceptiva periférica, há o surgimento de uma proteína de cadeia facilitativa, a Proteína Fos nos neurônios pós-sinápticos do corno dorsal da medula espinhal (MUNGLANI & HUNT, 1995) e no núcleo do NTET (HATHAWAY et al., 1995).

Esse conhecimento tem sido utilizado para determinar a localização de regiões receptoras de informações nociceptivas, como também para determinar o sítio de ação de drogas. Essa metodologia tem ajudado a reafirmar a importância do subnúcleo interpolar e do subnúcleo oral no processamento de informações nociceptivas advindas da região orofacial (HUOPANIEMI et al., 1992).

Do tronco cerebral, a informação nociceptiva proveniente da região orofacial é conduzida para o tálamo e daí para o córtex cerebral. A projeção espinotalâmica ao tálamo ventrobasal e sua projeção ao córtex somatossensorial são responsáveis pelo componente sensorial discriminativo

da dor, enquanto que as fibras nervosas que se projetam para o tálamo medial e deste, para o córtex frontal, estão relacionadas com o componente afetivo da dor (AGHABEIGI, 1992).

Há evidências de que as vias nociceptivas especializadas no sistema nervoso periférico e corno dorsal estão sujeitas a modulação por sistemas de controle descendentes extrínsecos de áreas cerebrais superiores, podendo influenciar nas experiências comportamentais de dor em humanos (DUBNER & BENETT, 1993).

Entendendo-se a origem da dor, pode-se facilitar o desenvolvimento de novas estratégias para tratamentos mais efetivos (MILLAN, 1999).

2.1.2 - INFLAMAÇÃO E DOR

A dor é, sobretudo, um mecanismo de proteção do organismo que ocorre quando um tecido é lesado. No entanto, existem mecanismos responsáveis pela intensificação da dor que, em determinadas circunstâncias, fazem com que ela deixe de ser um sinal de alerta para se tornar uma patologia (CODERRE et al., 1993).

O trauma ou a inflamação tecidual promove a liberação de uma série de substâncias neuroquímicas nos tecidos, como a bradicinina proveniente dos vasos lesados, que tem um potente efeito pró-inflamatório, sendo uma das substâncias endógenas indutoras de dor mais potentes (SWIFT et al., 1998), íons potássio liberados das células rompidas; prostaglandinas, que são liberadas através de uma cascata de reações; histamina, liberadas dos mastócitos; serotonina, das plaquetas e substância P, que é encontrada em algumas fibras de pequeno diâmetro e podem ser liberadas das terminações nervosas, nos terminais axônicos (SESSLE, 1995).

A liberação e a difusão dessas substâncias promovem o aumento da permeabilidade capilar e o extravasamento plasmático; excitam e sensibilizam os nociceptores aferentes primários (fibras de pequeno diâmetro) e são responsáveis pela irradiação da dor a partir do sítio da injúria e a subsequente inflamação do tecido subjacente, processo conhecido como sensibilização periférica (HU et al., 1994).

A sensibilização periférica é responsável pela hiperalgesia, que é o aumento da sensibilidade a estímulos nocivos, e pela alodínia, uma resposta dolorosa provocada por estímulo normalmente não-nocivo (HU et al., 1994; CODERRE et al., 1993; FILLINGIM et al., 1998).

Um mecanismo similar pode ocorrer no sistema nervoso central, onde o aumento na liberação de mediadores químicos na sinapse entre as

fibras periféricas e os neurônios do subnúcleo caudal, ou do corno dorsal da medula espinhal, pode causar um aumento da excitabilidade e do campo receptivo desses neurônios, diminuição no limiar a estímulos mecânicos e aumento da atividade espontânea, constituindo o processo conhecido como sensibilização central (HU et al., 1994; SESSLE, 1995).

Esse processo de sensibilização central pode ser produzido por injúria ou inflamação de tecidos profundos ou viscerais e está relacionado à hiperalgesia secundária e manifestações de dor difusa e referida associadas à injúria ou à inflamação de tecidos profundos (HU et al., 1994).

A aplicação de um agente irritante inflamatório na periferia pode induzir considerável neuroplasticidade funcional nas propriedades dos campos mecanorreceptivos cutâneos e profundos dos neurônios nociceptivos do subnúcleo caudal trigeminal, no entanto os impulsos profundos são especialmente efetivos em provocar estas mudanças neuroplásticas (YU et al., 1993).

O aumento na atividade neuronal em resposta à injúria tecidual pode levar a mudanças na expressão genética e a mudanças prolongadas no sistema nervoso. Essas mudanças incluem a ativação de outros receptores, envolvendo aminoácidos excitatórios, neuropeptídeos (substância P), neurotrofinas e quinases envolvidas no processo de fosforilação (REN &

DUBNER, 1993). Tais mudanças funcionais parecem contribuir para o processo de hiperalgesia e dor espontânea associadas à injúria tecidual.

As respostas dolorosas associadas a esse processo inflamatório agudo têm sido estudadas através de técnicas eletromiográficas, uma vez que a administração de óleo de mostarda na ATM produz respostas reflexas nos músculos da mastigação caracterizadas pela co-ativação dos músculos digástrico e masseter (YU et al., 1994; TAMBELI et al., 1997).

Os mecanismos fisiológicos envolvidos no processamento da informação nociceptiva proveniente da ATM podem, também, ser estudados através de modelos comportamentais. MIAMPAMBA et al. (1993) relataram ser de grande importância o desenvolvimento de modelos experimentais para o estudo da dor em animais.

2.2.3 - DOR E DISFUNÇÕES CRANIOMANDIBULARES

A disfunção craniomandibular tem etiologia variada e, na grande maioria das vezes é multifatorial, sendo considerada uma síndrome por vários autores. Os sinais e sintomas comumente relacionados a essa disfunção têm diferentes origens, o que dificulta seu diagnóstico (MACARI, 2000).

As condições dolorosas craniomandibulares representam um grande desafio para a Odontologia em virtude da sua alta incidência, do desconforto

que causam aos pacientes, e do grande número de insucessos no tratamento das mesmas (VON KORFF, 1995).

Estudos epidemiológicos demonstraram que aproximadamente 32% da população adulta sofre de algum tipo de disfunção craniomandibular e que 70% dos casos são acompanhados por dor (ALDER et al., 1992). Um estudo feito por IRVING et al., (1999) demonstrou que a dor relacionada à disfunção temporomandibular é a mais comum na região orofacial.

Apesar da alta incidência das condições dolorosas craniomandibulares, particularmente das que afetam a articulação temporomandibular (ATM), ainda não há um consenso com bases científicas a respeito do tratamento mais adequado para esses casos (VON KORFF, 1995). Isso se deve, principalmente, ao conhecimento limitado a respeito dos mecanismos neuroquímicos envolvidos nessas condições e à falta de modelos experimentais apropriados para o estudo das mesmas.

Novos mediadores químicos e receptores têm sido identificados, apontando que muito se tem a saber sobre esse sintoma que tantos transtornos trazem ao indivíduo.

O estudo da dor proveniente dos tecidos craniomandibulares tem sido feito, principalmente na última década, em modelos animais, nos quais

procuram-se reproduzir de forma similar, as condições clínicas encontradas em seres humanos (REN & DUBNER, 1993).

2.2 - TESTE DA FORMALINA

O teste da formalina em ratos, é sensível a várias classes de drogas analgésicas e é considerado um modelo de nocicepção válido e seguro (TJOLSEN et.al., 1992; TENG & ABBOTT, 1998). O estímulo nocivo deste modelo corresponde a uma injeção de formaldeído a 37% diluído em solução salina, administrado subcutaneamente na região dorsal da pata traseira (DUBUISSON & DENNIS, 1977).

A resposta comportamental ao estímulo nocivo causado pela injeção de formalina na pata é quantificada pelo período de tempo que o animal lambe a pata e o número de vezes que o animal levanta rapidamente a pata, na qual foi injetada a solução (DUBUISSON & DENNIS, 1977).

Dois períodos distintos de alta atividade de resposta podem ser identificados, uma fase inicial breve de dor intensa que ocorre durante os 5 primeiros minutos e uma fase tardia tônica de dor moderada que ocorre de 20 a 30 minutos após a injeção (ROSLAND, 1990). Entre a primeira e a segunda fase ocorre um período de relativa inatividade denominado de interfase.

Com relação aos mecanismos responsáveis pela primeira e segunda fases do teste da formalina, tem sido sugerido que a primeira fase é decorrente da estimulação direta de nociceptores e que a segunda fase poderia ser causada por impulsos aferentes, provocados por inflamação local (HUNSKAAR & HOLE, 1987).

Da mesma forma, tem sido proposto que a segunda fase parece ser dependente de modificações no sistema nervoso central, induzidas pela atividade neural gerada durante a primeira fase (CODERRE et al., 1990), uma vez que a administração local de bupivacaína ou intratecal de lidocaína inibe as respostas comportamentais causadas pela injeção de formalina na pata, se realizada 5 minutos antes da administração de formalina, mas não 25 minutos após. Tem sido proposto que os aminoácidos excitatórios (CODERRE & MELZACK, 1992), assim como a substância P (MJELLEM-JOLY et al., 1992), contribuiriam para o desenvolvimento do processo de sensibilização central e nocicepção persistente em resposta à injeção subcutânea de formalina na pata.

Por outro lado, a sensibilização central produzida pelos impulsos da primeira fase da formalina, pode não ser suficiente para manter as respostas comportamentais nociceptivas na segunda fase. TAYLOR et al., 1995, verificaram que a administração local de um derivado quaternário da lidocaína hidrofílica 10 minutos após a administração de formalina na pata, inibe a

segunda fase de respostas, o que sugere a participação do componente periférico.

Em adição, a importância do componente periférico na segunda fase do teste foi verificada por PARADA et al. (1999). O trabalho realizado pelos autores sugere o envolvimento da histamina na segunda fase de respostas induzidas pela administração de formalina na pata traseira de ratos, uma vez que, a co-administração do antagonista seletivo do receptor histaminérgico do tipo H₁, pirilamina com a formalina, diminui significativamente a resposta comportamental caracterizada pela elevação rápida da pata injetada.

Por ser um teste comportamental, o teste da formalina apresenta variáveis como espécie, sexo, idade do animal, estresse, temperatura ambiente, que devem ser rigorosamente controladas para que os resultados obtidos sejam confiáveis. A temperatura ambiente exerce uma influência importante na resposta nociceptiva. A primeira fase parece não sofrer esse efeito, por outro lado, a resposta nociceptiva da segunda fase pode ser muito menor se a temperatura for diminuída de 25°C a 20°C. A intensidade e a duração da resposta aumentam com a elevação da temperatura ambiente de 20°C para 28°C (ROSLAND, 1991).

Em 1989, CLAVELOU et al. propuseram uma modificação no teste da formalina para estudar os mecanismos dolorosos provenientes da região orofacial de rato. Para isso, uma solução diluída de formalina era administrada

subcutaneamente no lábio superior e a resposta comportamental nociceptiva caracterizada pelo ato de coçar a região orofacial era registrada. Dois períodos distintos de atividade intensa caracterizada pelo ato de coçar a região orofacial foram identificados: uma fase inicial entre 0 a 3 minutos imediatamente após a injeção e uma fase tardia entre 18 a 42 minutos após a injeção. Em 1995, através da utilização de diferentes concentrações de formalina, os mesmos autores verificaram que o teste orofacial da formalina poderia ser realizado utilizando-se concentrações entre 0,5 e 2,5 % e que os sinais histológicos de inflamação e injúria tecidual induzidos pela mesma se agravavam com o aumento da concentração de formalina.

ROVERONI et al. (2001) desenvolveram um modelo comportamental através da administração de formalina na região da ATM de ratos. Os resultados deste trabalho demonstraram que a administração de diferentes concentrações de formalina na região da ATM de ratos produz uma resposta comportamental quantificável. Essa resposta é caracterizada por três tipos de comportamentos: a exacerbação do comportamento de coçar a região orofacial, o ato de levantar rapidamente a cabeça e o ato de tombar a cabeça para o lado injetado. A resposta comportamental induzida pela administração de formalina na região da ATM de ratos, avaliada através da soma dos comportamentos de coçar a região orofacial e levantar rapidamente a cabeça, aumentou significativamente a partir da concentração de 1,5 % deste agente

irritante (ROVERONI et al., 2001). Este dado está de acordo com o obtido por CLAVELOU et al. (1995), para o teste da formalina no lábio.

A injúria tecidual causada por trauma ou induzida experimentalmente pela administração de uma substância nociva, como no caso da formalina, provoca a liberação, no local, de uma série de substâncias que estimulam as fibras aferentes nociceptivas primárias (HU et al., 1994).

As respostas comportamentais nociceptivas caracterizadas pela exacerbação do ato de coçar a região orofacial e as caracterizadas pelo ato de levantar rapidamente a cabeça podem ser utilizadas como índice de dor orofacial para o teste da formalina na ATM de ratos, seja quando avaliadas separadamente ou em conjunto, pela soma das mesmas (ROVERONI et al., 2001).

2.3 - ÓXIDO NÍTRICO

Dentre os possíveis fatores envolvidos nas condições dolorosas da ATM, o óxido nítrico (NO) tem sido bastante investigado nos últimos anos.

Na natureza, o NO é formado a partir do oxigênio (O) e do nitrogênio (N) na atmosfera, durante tempestades de raios, pela combustão do ar num arco elétrico. Nesta altíssima temperatura, pequenas partes de N e O do ar transformam-se em uma molécula gasosa simples, encontrada em pequenas

quantidades no ar atmosférico, um gás incolor à temperatura ambiente, pouco solúvel em água, sendo muito mais solúvel em solventes apolares, tal como o n-hexano, onde apresenta uma concentração na saturação de 0,13 M, altamente tóxica devido à presença de radical livre (elétron livre) que a torna um agente químico altamente reativo. Quando diluído, o NO tem uma meia vida de menos de 10 segundos, devido à sua rápida oxidação a nitrito e nitrato (FLORA FILHO & ZILBERSTEIN, 2000).

O NO tende a dissolver-se seletivamente pela membrana das células. Simulações da difusão do óxido nítrico revelam que esta molécula percorre distâncias surpreendentes a partir da célula que a produz, antes de sua inativação (QUEIROZ. & BATISTA, 1999).

De forma menos dramática do que ocorre na natureza, mas com consequências biológicas importantes, o NO é também formado numa reação catalisada por enzimas entre o oxigênio molecular e a L-arginina em células e tecidos, principalmente de espécies mamíferas, espécies inferiores (FLORA FILHO & ZILBERSTEIN, 2000), como protozoários e plantas.

2.3.1 ÓXIDO NÍTRICO COMO SEGUNDO MENSAGEIRO

A descoberta de que o NO atua como segundo mensageiro começou com uma observação acidental. Já se sabia que a acetilcolina (Ach) tinha uma ação vasodilatadora, atuando na musculatura lisa de vasos sanguíneos. Entretanto, quando Robert Furchgott, no final da década de 1970, estudava a resposta de fragmentos de aorta de coelho submetidos a vários agentes biológicos, verificou que estes fragmentos dissecados de aorta, na forma de tiras, quando eram incubados com Ach, o efeito vasodilatador deste agente não era reproduzido *in vitro*. Posteriormente, FURCHGOTT & ZAWADSKI (1980) substituíram os fragmentos em forma de tiras por anéis e, surpreendentemente, descobriram que essa nova preparação era sensível à Ach. Os autores observaram que quando a aorta era fragmentada em anéis, a delicada camada endotelial era preservada e sugeriram que as células endoteliais vasculares estavam, de alguma forma, envolvidas na resposta vascular induzida pela Ach. Estudos subseqüentes demonstraram que a Ach se liga a receptores específicos na superfície das células endoteliais, induzindo a produção e liberação de um agente vasodilatador responsável pelo relaxamento das células musculares lisas. Este agente foi identificado como sendo o Óxido Nítrico.

2.3.2. - PRÓS E CONTRAS RELACIONADOS AO ÓXIDO NÍTRICO

A descoberta da dilatação de vasos sanguíneos, mediada por NO explica a ação da nitroglicerina, que tem sido utilizada desde o século XIX para tratar a dor de angina, que resulta da circulação inadequada de sangue para o coração. A nitroglicerina é metabolizada para NO, que estimula o relaxamento das células do músculo liso que revestem os vasos sanguíneos do coração, aumentando a circulação sanguínea para o órgão. IADECOLA (1993) cita que o NO atua como um poderoso vasodilatador cerebral, mantendo o fluxo cerebral basal e levando a aumento do fluxo sanguíneo sob atividade neuronal intensa.

A importância do NO em manter a circulação sanguínea é também ilustrada pela condição, muitas vezes fatal, de choque séptico, na qual os vasos sanguíneos ficam dilatados pelo corpo todo, levando a uma queda brutal na pressão arterial. O choque séptico é ativado pelas moléculas liberadas da parede celular de certas bactérias durante infecções. O material da parede celular ativa a liberação sistêmica de NO por macrófagos, o que resulta em seguida dilatação generalizada dos vasos. Os inibidores da NOS (Óxido Nítrico Sintase) têm se mostrado promissores como tratamento efetivo para o choque séptico. Um outro benefício do NO é a inibição da replicação viral (LOWENSTEIN et al., 1993).

Pelo lado negativo, o dano às células do cérebro que acompanham um derrame isquêmico pode ser causado pela estimulação excessiva da enzima NOS, causando assim, um excesso de NO no local, levando a uma ação destrutiva. O NO, apesar de ser um dos venenos contidos na poluição, em pequenas quantidades, é fundamental para o bom funcionamento do organismo. O NO não pode ser regulado por intervenção ao nível de receptores porque não existe nenhum receptor para esta molécula. Portanto, ele só pode ser regulado através de mecanismos relacionados ao controle de sua síntese (QUEIROZ & BATISTA, 1999).

2.3.3 - INTER-RELAÇÕES FUNCIONAIS DO NO

Em 1985, STUEHR & MARLETTA isolaram, de camundongos mutantes, macrófagos que não possuíam habilidade normal de fagocitar células anormais e bactérias. O metabolismo do nitrogênio nestes animais também demonstrava anormalidade, quando comparado ao dos animais normais. Os autores verificaram que a inflamação causada por infecção bacteriana é acompanhada pelo aumento na excreção de nitratos na urina, no caso de camundongos normais. No entanto, tal reação não foi exibida pelos membros da variedade mutante. Na época, a relação entre a inflamação e a excreção de nitratos era obscura. O que os autores descobriram subsequenteemente, foi que a capacidade de fagocitar bactérias dos

macrófagos normais em cultura de células, dependia da presença de arginina no meio. Na falta deste aminoácido, os macrófagos não conseguiam destruir os patógenos invasores.

MARLETTA et al. (1988) identificaram o NO como um produto da oxirredução da L-arginina. FUKUTO (1996) mostrou que o NO é formado a partir da L-arginina pela enzima NO-Sintase (NOS).

A NOS é uma enzima constitutiva presente em células endoteliais (eNOS) e em células neuronais (nNOS). Uma terceira isoforma, a induzida (iNOS), é gerada em resposta a estímulos inflamatórios ou imunológicos, que podem sustentar uma produção de altos níveis locais de NO (QUEIRÓZ & BATISTA, 1999).

As isoenzimas são semelhantes estruturalmente, porém reguladas de modo diverso e induzidas por genes localizados nos cromossomos 7 (nNOS), 17 (eNOS) e 12 (iNOS). As formas constitutivas (eNOS e nNOS) são cálcio-dependentes e produzem menos NO em relação à forma induzida (iNOS), que não é cálcio-dependente. Um aspecto marcante desta molécula é sua capacidade de ser benéfica ou potencialmente tóxica, conforme a concentração ou depuração tecidual. Uma vez induzida, a iNOS é capaz de produzir NO por um longo tempo, levando, em situações patológicas, a uma produção excessiva. Assim, o que deveria ser tóxico para micróbios, parasitas ou células tumorais, pode também, lesar células saudáveis. Este mecanismo é

co-responsável pela maioria dos processos inflamatórios e auto-imunes (FLORA FILHO & ZILBERSTEIN, 2000).

A iNOS é induzida em macrófagos e outras células sanguíneas fagocitárias, como parte da reação inflamatória. O NO é um radical livre (possui um elétron livre que reage com outros radicais livres, principalmente o superóxido). A reação entre estes dois radicais livres no citoplasma do macrófago produz um agente oxidante poderoso, o peroxinitrito (ONOO-), que pode reagir com vários tipos de moléculas biológicas, incluindo lipídios, DNA e proteínas. Acredita-se que o peroxinitrito é um agente primário produzido nos macrófagos que atacam os patógenos invasores. A desativação metabólica do NO em ONOO- gera os nitratos que aparecem na urina de animais cujos macrófagos estão engajados em uma atividade fagocítica extensiva durante o processo inflamatório (QUEIROZ & BATISTA, 1999).

O NO parece estar envolvido nos três níveis de percepção da dor, o cerebral (DICKENSON, 1995), espinhal (GORDH et al., 1995) e periférico (PALMGREN et al., 1996). É uma molécula de extrema importância para o organismo; está envolvida na inibição da agregação plaquetária, na adesão das células e no controle da vasodilatação; participa também da inibição do crescimento de tumores, na ereção peniana e no reforço da imunidade contra doenças parasitárias (DRAPIER et al., 1988).

MONCADA et al. (1991) citam o NO como um importante regulador de várias funções imunológicas e inflamatórias.

Autores como SCHMIDT & WALTER (1994) denominam o NO como sendo uma “faca de dois gumes”. ALCARAZ & GUILLEN (2002) relatam que o NO , quando em baixas concentrações, desempenha um papel homeostático, enquanto em estados patológicos, está em maiores concentrações, levando a um efeito danoso.

O NO é um mediador biológico. No sistema nervoso ele atua como neurotransmissor e também modula a inflamação aguda. No Sistema Nervoso Periférico, ele bloqueia o estímulo nociceptivo através do aumento do nível de GMPc nos neurônios pós-sinápticos (BERRAZUETA et al., 1993).

Estudos recentes de vários laboratórios colocam o NO como um importante modulador de várias desordens inflamatórias agudas e crônicas (LAROUX et al., 2000; GUHRING et al., 2001).

A modulação farmacológica dos níveis de NO e sua biossíntese podem ser uma estratégia terapêutica para várias condições patológicas. Trabalhos recentes neste campo mostram alternativas para o tratamento de desordens inflamatórias, dor, doenças neurológicas, choques, arteriosclerose e câncer. (ALCARAZ & GUILLEN, 2002).

Tem sido proposto que o óxido nítrico promove hiperalgesia ao nível medular (CODERRE & YASHPAL, 1994; MACHELSKA et al., 1997; MACHELSKA et al., 1998; HALEY, 1998), além de possuir um importante papel na transmissão da informação nociceptiva durante o teste da formalina na pata de ratos (ROCHE et al., 1996; YAMAMOTO et al., 1993; MALMBERG & YAKSH, 1993; LAWAND et al., 1997).

THOMPSEN et al. (1996) estudaram, em humanos, o efeito de um doador de NO (glyceryl trinitrate), os dados obtidos mostraram que o NO participa da nocicepção central.

Ao contrário do que tem sido observado ao nível central, o papel do óxido nítrico periférico na resposta dolorosa tem gerado controvérsias na literatura.

Outros autores sugerem que o NO endógeno periférico tem um importante papel na hiperalgesia induzida mecanicamente (NAKAMURA et al., 1996; SEMOS & HADLEY, 1994).

Tem sido demonstrado que a administração periférica do substrato da NOS, a L-arginina, pode tanto aumentar, como reduzir as respostas nociceptivas, induzidas pela administração subcutânea de formalina na pata de ratos, sugerindo que o óxido nítrico periférico pode apresentar um duplo papel na modulação dolorosa, induzindo tanto respostas nociceptivas como antinociceptivas (KAWABATA et al., 1994).

Um estudo realizado por GAD & KHATTAB (2000) em pata de ratos, mostrou que o NO está envolvido tanto no desenvolvimento da inflamação aguda, quanto da inflamação crônica e que os inibidores da NOS têm uma potente atividade antiinflamatória.

Os inibidores da NOS podem prevenir o desenvolvimento da hiperalgesia (IGOR et al., 1992), tanto pela administração intratecal de NMDA ou por injúria nervosa periférica. O NO poderia, assim, contribuir em alguns estados de dor crônica (HALEY, 1998).

Um estudo feito por SUZUKI et al. (1999) no qual foram utilizados agentes antinociceptivos no teste da pressão na pata de ratos, concluíram que o efeito antinociceptivo deve-se ao aumento na produção do NO periférico.

Para testar a hipótese de que o NO está envolvido no mecanismo de dor periférica, CHEN & LEVINE (1999) compararam a estimulação mecânica em pata de ratos, antes e depois da injeção de PGE2 e sua co-administração com L-NMMA (N^G -monomethyl-L-arginina), um inibidor da NOS; ou seu isômero inativo, D-NMMA (N^G -monomethyl-D-arginina). Constataram que a redução do limiar mecânico e o aumento numeral do potencial de ação, para que fosse sustentada a estimulação mecânica produzida pela PGE2, foi bloqueada pelo L-NMMA e não pelo D-NMMA.

Clinicamente tem sido observado que as condições dolorosas temporomandibulares estão associadas a um aumento significativo do nível de

óxido nítrico no fluído sinovial da ATM (TAKAHASHI et al., 1996; MURREL et al., 1996), possivelmente porque a dor constante promove alterações plásticas no sistema nervoso que resultam numa produção aumentada do mesmo, pelas fibras trigeminais periféricas (CROSBY et al., 1994; AMIN et al., 1995;). Dados recentes sugerem que esteróides podem interagir com vários mediadores do processo inflamatório e atuar diretamente nos músculos para modular a síntese de NO, que pode ser induzida pelo uso de estrógeno (DAO et al., 1998).

Um estudo de imunohistoquímica realizado por HIDETAKA et al. (2001) comprova que a iNOS é expressa no tecido sinovial de pacientes com DTMs; isso indica que o NO é produzido localmente nas ATMs afetadas por desarranjo interno e pode estar associado a processos erosivos da cartilagem articular (McCARTNEY-FRANCIS et al., 2001).

Uma das hipóteses levantadas sobre o papel do óxido nítrico periférico nas condições dolorosas da ATM, é de que a dor seria desencadeada pela sensibilização do neurônio aferente primário pelo óxido nítrico (ANBAR & GRATT, 1998). Seguindo essa linha de raciocínio, autores têm demonstrado que a injeção subcutânea de NO provoca dor em humanos (HOLTHUSEN & ARNDT 1994).

BING & LOMNICKA (2002) citaram que os doadores de NO previnem eventos cardiovasculares trombóticos, danos à mucosa gástrica e alterações da função renal em indivíduos sob tratamento com AINES. Outros autores

estudaram a ação de doadores de NO e perceberam que a aplicação tópica destes causa dor em humanos (BERRAZUETA et al. *apud* FERREIRA et al., 1992).

Por outro lado, há evidências de que o óxido nítrico periférico reduz a resposta dolorosa desencadeada pela administração de prostaglandina E₂ (PGE₂) na pata de rato (IGOR et al., 1992) e media o efeito analgésico da morfina ao nível periférico (FERREIRA et al., 1991; GRANADOS-SOTO et al., 1997) e dos agonistas dos receptores opióides delta e capá (NOZAKI-TAGUCHI & YAMAMOTO, 1998), como demonstrado no teste da formalina na pata.

PAUL-CLARK et al. (2001), investigaram os efeitos do NO na inflamação induzida por carragenina em ratos, através da administração local de inibidores da síntese do NO, depois, esses efeitos foram comparados com os obtidos através do uso de inibidores da NOS administrados via sistêmica. Os resultados mostraram que a produção local do NO é protetora, pois tem a capacidade de regular a liberação de mediadores pró-inflamatórios. Notou-se, também, que os inibidores da síntese do NO possuem diferentes efeitos antiinflamatórios, dependendo da via de administração e do modelo de dor utilizado.

Os efeitos do doador de NO (SIN-1) variam dependendo da dose, sendo que os efeitos antinociceptivos são predominantes, embora altas doses possam intensificar a dor (SOUSA & PRADO, 2001; GUHRING et al., 2001).

A relação existente entre o óxido nítrico periférico e a dor ainda é pobremente conhecida e outros estudos são necessários para que possamos compreender melhor o papel do óxido nítrico periférico nas condições dolorosas temporomandibulares.

3. Material e Métodos:

3.1. Animais:

Para realização deste trabalho foram utilizados 141 ratos machos Wistar, pesando entre 150 a 250 g, provenientes do Biotério Central da Unicamp (CEMIB). Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas (5 animais por gaiola) contendo maravalha, em ambiente com controle de luminosidade (ciclos claro/escuro de 12hs) com alimentação e água, *ad libitum*.

3.2. Teste Comportamental:

As sessões de teste foram realizadas durante a fase clara, entre 08 h e 12 h (em virtude do ciclo circadiano do cortisol, que poderia interferir nas respostas analisadas), em sala silenciosa, com temperatura ambiente mantida a 25°C (ROSLAND, 1991). Durante o teste, os ratos não tiveram acesso à água ou à comida. Para minimizar o estresse durante as sessões experimentais, os animais foram previamente manipulados pelo pesquisador por um período mínimo de 7 dias.

A experimentação animal seguiu as diretrizes propostas pelo Comitê para Pesquisa e Ética da Associação Internacional para Estudo da Dor (IASP) em animais conscientes (ZIMMERMANN, 1983).

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal, Instituto de Biologia – UNICAMP, Protocolo nº 137-1, de 18/07/2000 (**ANEXO 3**).

Para a realização da análise comportamental, foi utilizada uma câmara de observação medindo 30x30x30 cm, com base e 3 laterais espelhadas e frente de vidro. Cada animal foi inicialmente colocado e mantido na câmara por 10 minutos, para habituar-se ao ambiente de experimentação e minimizar o estresse.

Depois desse período, o animal foi removido da câmara e anestesiado por inalação de Halotano. Para administração de drogas na região da ATM esquerda, foi utilizada uma agulha hipodérmica calibre 30, conectada a uma seringa de microlitro Hamilton (50 µl) por meio de um tubo de polietileno P50. A borda póstero-inferior do arco zigomático foi palpada e a agulha inserida na porção inferior da mesma, sendo avançada em direção anterior até contatar a região póstero-lateral do côndilo (**ANEXO 2, FIG. 8**).

Após a injeção periarticular, o animal foi imediatamente recolocado na câmara de observação e as respostas comportamentais nociceptivas caracterizadas pelo ato de coçar a região orofacial (CO), pelo ato de levantar

rapidamente a cabeça (LC) foram quantificadas utilizando-se respectivamente, um cronômetro e um contador de células. O período de observação foi de 45 minutos, divididos em 15 blocos de 3 minutos (Anexo 1). O comportamento CO foi quantificado em segundos e o comportamento LC, em número de vezes que ocorria, ao longo do experimento.

Os comportamentos nociceptivos induzidos pela administração de formalina na região da ATM, foram analisados conjuntamente pela soma do período de tempo que os animais apresentaram o comportamento de coçar a região orofacial (CO), com o número de vezes que os animais apresentaram o comportamento de levantar a cabeça (LC) ao longo do período de observação. Para a soma dos comportamentos, determinou-se que cada comportamento LC corresponde a 1 segundo (ROVERONI et al., 2001).

Terminado o período de observação, o sítio de aplicação da formalina foi confirmado *post-mortem* através do indicador de edema, caracterizado pelo extravasamento plasmático do corante Azul de Evans (0,1%), administrado endovenosamente (5mg/Kg), por canulação na veia femural, estando os animais sob anestesia com Uretano (1g/kg) e α -Chloralose (50mg/kg) via intraperitoneal. Decorridos 10 minutos, o animal foi sacrificado e perfundido com salina. Como o corante Azul de Evans se liga às proteínas plasmáticas (HASS et al., 1992), o local da injeção pode ser identificado visualmente pela presença do corante no sítio da injeção (TAMBELI et al., 1997), conforme **ANEXO 2 (FIG. 9)**.

3.3. SOLUÇÕES E DOSES EMPREGADAS

- **A-Chloralose** (1,2-0[2,2,2-Trichloroethyl-idene]- α -D-glucofuranose) Sigma.
- **Azul de Evans** (Sigma) dissolvido em NaCl a 0,9%, preparado numa concentração de 0,1%.
- **D-NMMA** (N^G -monomethyl-D-arginina); isômero inativo, dissolvido em salina (900 μ g/25 μ L), Sigma.
- **Formalina**; solução aquosa de formaldeído a 37% (Sigma), diluído em salina a 0,25%, 0,5%, 1,5% e 3%.
- **Halotano** (Cristália)
- **L-NMMA** (N^G -monomethyl-L-arginina), Sigma, dissolvido em salina (150, 450, e 900 μ g/25 μ L), Sigma.
- **SIN-1** (3-Morpholinosydnonimine), Sigma, dissolvido em salina (50, 200, 600 e 1200 μ g/25 μ L).
- **SNAP** (S-Nitroso-N-acetylpenicillamine), Sigma, dissolvido em salina (50, 200, 600 e 1200 μ g/25 μ L).
- **Solução salina** (NaCl) 0,9%
- **Uretano** (Ethyl carbamate), Sigma

3.4. Grupos experimentais:

Para realização deste trabalho os animais foram aleatoriamente divididos em diferentes grupos experimentais. Os diferentes tratamentos farmacológicos foram aplicados na região da ATM de ratos, num volume final de 50µl.

3.4.1 - *EFEITO DO INIBIDOR PERIFÉRICO DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE (L-NMMA) SOBRE O COMPORTAMENTO NOCICEPTIVO INDUZIDO PELA ADMINISTRAÇÃO DE FORMALINA NA ATM.*

Nesta fase inicial, para verificar o envolvimento do NO endógeno periférico nas respostas comportamentais nociceptivas, a salina 0,9% (n=10) ou o inibidor da NOS, L-NMMA (900 µg; n=5) foi administrado conjuntamente (25 µL) com a formalina (3%, 25 µL) na região da ATM de ratos. Como não houve diferenças significativas entre esses dois tratamentos, foram realizados experimentos adicionais, utilizando a formalina a 0,5%.

Para tanto, a salina (n=6) ou o inibidor da NOS (L-NMMA) foi co-administrado (25 µL) com a formalina 0,5% (25µL) na região da ATM de ratos, em diferentes concentrações : 150 µg, n=10; 450 µg, n=6 e 900 µg, n=6.

Para verificar a especificidade dos efeitos desencadeados pelo L-NMMA, o seu esteroisômero inativo, D-NMMA (900 µg, n=6), foi co-administrado com a formalina 0,5%, como descrito anteriormente.

Com o objetivo de investigar um possível efeito sistêmico do L-NMMA, o mesmo foi administrado (25µL) na máxima concentração utilizada no presente trabalho (900µg, n=6) na região da ATM contralateral à administração de formalina 0,25% (50µL).

3.4.2. - EFEITO DO DOADOR DE NO, SNAP, SOBRE O COMPORTAMENTO NOCICEPTIVO INDUZIDO PELA APLICAÇÃO DE FORMALINA NA ATM DE RATOS.

Nesta etapa, para verificar o possível papel terapêutico do NO periférico proveniente da ATM, o doador de NO, SNAP, foi co-administrado (25µL) em diferentes concentrações (50 µg, n=5; 200 µg, n=6; 600 µg, n=6 e 1200 µg, n=5) com a formalina (3%, 25µL) na região da ATM de ratos. Com o objetivo de investigar um possível efeito sistêmico do SNAP, o mesmo foi administrado na máxima concentração utilizada (1200 µg, n=6) na região da ATM contralateral à administração de formalina (1,5%, 50µL).

3.4.3. - EFEITO DO DOADOR DO NO PERIFÉRICO, SIN-1, SOBRE O COMPORTAMENTO NOCICEPTIVO INDUZIDO PELA ADMINISTRAÇÃO DE FORMALINA NA ATM.

O doador de NO, SIN-1, também foi co-administrado (25µL) com a formalina (3%,25µL) na região da ATM de ratos em diferentes concentrações: 50µg, n=5; 200µg, n=5; 600µg, n=5 e 1200µg, n=5). Da mesma forma que o SNAP, para verificar um possível efeito sistêmico, foi realizado um grupo adicional, no qual o SIN-1 foi administrado (25µL) na maior concentração testada anteriormente (1200µg, n=5) na região da ATM contralateral à da administração de formalina (1,5%, 50µL).

3.5. Análise Estatística:

Os dados obtidos foram submetidos à Análise de Variância. Para verificar se havia diferenças significativas entre as respostas comportamentais aos diversos tratamentos empregados, tanto de L-NMMA quanto do SIN-1 e SNAP, foi aplicado o teste de Tukey ($p < 0,05$).

O possível efeito sistêmico da mais alta concentração de L-NMMA, SIN-1 e SNAP utilizada (900µg), foi avaliado comparando-se o efeito de sua

aplicação na ATM contralateral à que recebeu formalina com a de salina, através do teste t.

Para testar a especificidade dos efeitos desencadeados pelo L-NMMA, os resultados obtidos com a co-administração de seu par esteroisômero D-NMMA foi comparado com a de salina através da aplicação do teste T. Valores de $p < 0,05$ foram indicativos de significância estatística.

As respostas comportamentais nociceptivas, caracterizadas pela exacerbação do ato de coçar a região orofacial (CO) e pelo ato de levantar rapidamente a cabeça (LC), utilizadas como índice de dor orofacial para o teste da formalina na ATM de ratos, foram analisadas em conjunto, pela soma das mesmas.

Os resultados foram apresentados como média \pm EP. Os cálculos estatísticos foram realizados através da utilização do programa Sigma Stat.

4. - RESULTADOS

4.1 - EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO LOCAL DO INIBIDOR DA ENZIMA NOS SOBRE O COMPORTAMENTO NOCICEPTIVO INDUZIDO PELA ADMINISTRAÇÃO DE FORMALINA NA ATM DE RATOS.

A co-administração do inibidor da NOS, L-NMMA, na concentração de 900µg/25µL na ATM, não promoveu uma alteração significativa no comportamento nociceptivo induzido pela administração de formalina (3%, 25µL) na ATM, em relação à co-administração de salina (Grupo controle; **TAB.1, FIG.1**).

Conseqüentemente, o efeito do L-NMMA foi testado em animais que foram submetidos à administração de uma baixa concentração de formalina (0,5%) na ATM, com o objetivo de excluir a possibilidade de uma alta concentração da mesma (3%), já ter produzido uma resposta nociceptiva máxima. Isso mascararia, por exemplo, um possível aumento dessas respostas pela co-administração do L-NMMA.

A **TAB. 2** e **FIG. 2** mostram que a co-administração do L-NMMA 900µg/25µL com uma concentração de formalina mais baixa (0,5%), promoveu um aumento significativo das respostas nociceptivas induzidas pela formalina, em relação à de salina (grupo controle). Por outro lado, a co-administração do isômero inativo do L-NMMA, ou seja, o D-NMMA, não produziu alterações significativas nessas respostas, quando comparada com a co-administração de salina (grupo

controle). Vale ressaltar que a administração do L-NMMA 900µg na ATM contralateral à que recebeu a formalina (0,5%), não alterou as respostas comportamentais nociceptivas induzidas pela mesma, descartando portanto, um possível efeito sistêmico do L-NMMA.

TABELA 1 –Efeito da co-administração de L-NMMA (900ug) e formalina (3%) na região da ATM de ratos sobre o comportamento nociceptivo.

GRUPOS	Soma dos comportamentos (s)
Formalina 3% + Salina 0,9% (n=10)	227,026±7,97
Formalina 3% + L-NMMA 900ug (n=4)	233,955±15,343

Dados expressos como média ± EPM.

Formalina 3%

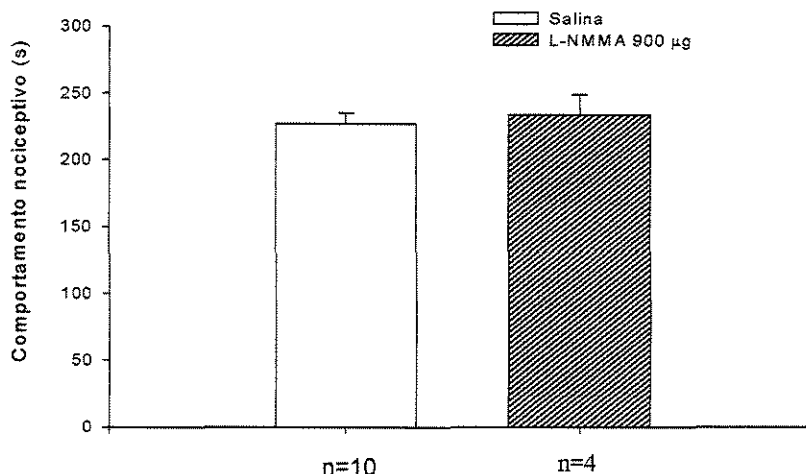


FIGURA 1 – Efeito da co-administração do L-NMMA (900µg) e formalina (3%) na região da ATM de ratos sobre o comportamento nociceptivo. Cada coluna representa média±EPM.

TABELA 2 –Efeito da administração de L-NMMA e D-NMMA na ATM ipsilateral de ratos sobre o comportamento nociceptivo.

Grupos	Soma dos comportamentos (s)
Formalina 0,5% + salina 0,9% (n=6)	76,32± 10,10
Formalina 0,5% + L-NMMA 900ug (ip) (n=6)	240,81±48,88*
Formalina 0,5% + L-NMMA 900ug (ct) (n=6)	80,84± 8,81
Formalina 0,5% + D-NMMA 900ug (ip) (n=5)	62,69±4,51

*p<0,05 indica diferença significativa. Dados expressos como média±EPM.

Formalina 0.5% + L-NMMA

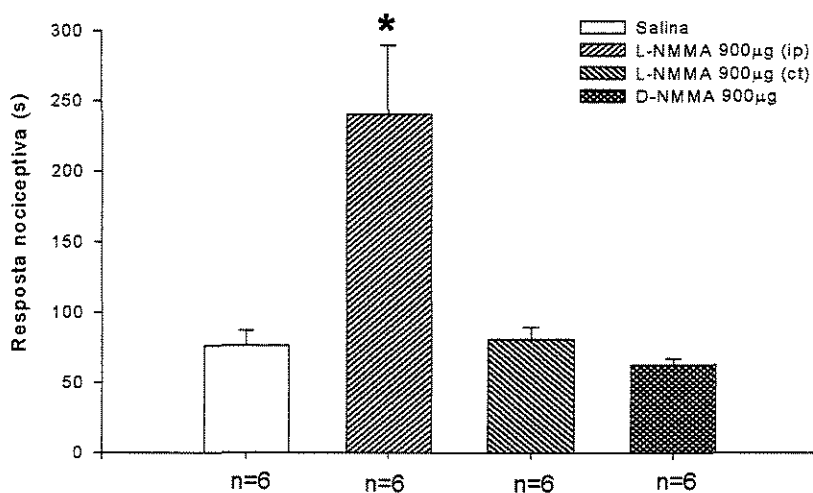


FIGURA 2 – Efeito da administração de L-NMMA e D-NMMA na ATM ipsilateral à aplicação de formalina (0,5%) e de L-NMMA na região da ATM contralateral de ratos sobre o comportamento nociceptivo (s). Cada coluna representa média±EPM. $p < 0,05$ indica diferença significativa.

Como se pode observar na **TAB.3** e **FIG.3**, a co-administração do L-NMMA com a formalina 0,5%, promoveu um aumento da resposta comportamental nociceptiva de maneira dose dependente. O aumento da resposta nociceptiva produzido pela co-administração do L-NMMA na concentração de 900µg foi significativamente maior ($p < 0,05$, teste de Tukey) que o produzido pelas concentrações de 150µg e 450µg. Esses dados sugerem que o NO endógeno periférico sugere efeito antinociceptivo na dor proveniente da ATM.

TABELA 3 –Efeito da co-administração de diferentes concentrações de L-NMMA e formalina (0,5%) na região da ATM de ratos sobre o comportamento nociceptivo.

GRUPOS	Soma dos comportamentos (s)
Formalina 0,5% + L-NMMA 150 ug (n=10)	94,73±17,48
Formalina 0,5% + L-NMMA 450 ug (n=6)	135,82±12,49
Formalina 0,5% + L-NMMA 900 ug (n=6)	240,81±48,88 *

*p<0,05 (T. Tukey) indica diferença significativa. Dados expressos como média ± EPM.

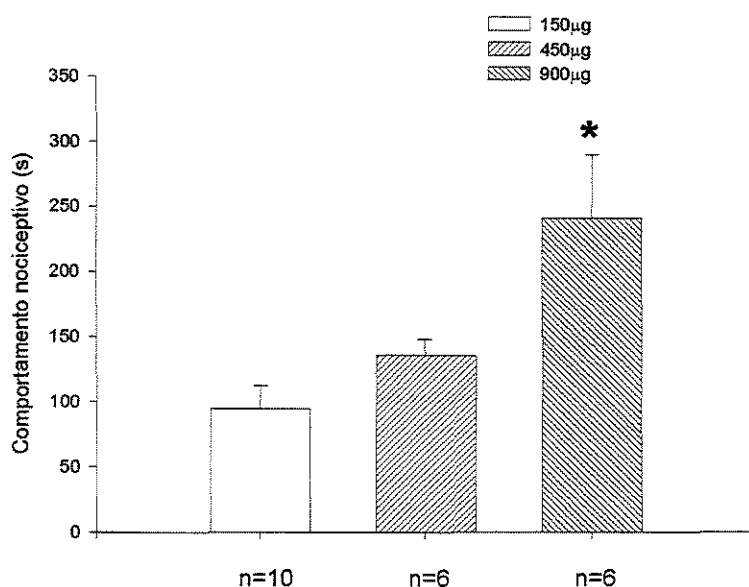


FIGURA 3 –Efeito da co-administração de diferentes concentrações de L-NMMA e formalina (0,5%) na região da ATM, de ratos, sobre o comportamento nociceptivo (em segundos). Cada coluna representa média±EPM. p<0,05 (t.Tukey); diferença significativa.

4.2. - EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO PERIFÉRICA DO DOADOR DE NO (SNAP) SOBRE O COMPORTAMENTO NOCICEPTIVO INDUZIDO PELA ADMINISTRAÇÃO DE FORMALINA NA ATM.

A administração do SNAP (1200µg) na ATM contralateral à administração de formalina (1,5%, 50µL) não interferiu nas respostas comportamentais nociceptivas induzidas pela formalina (**TAB.4**). A co-administração de SNAP (1200µg) e formalina (3%) induz uma redução significativa do comportamento nociceptivo em relação à salina 0,9% e à sua aplicação na ATM contralateral (**FIG.4**).

TABELA 4 –Efeito da administração de SNAP na ATM ipsilateral à aplicação de formalina (3%) e na região da ATM contralateral de ratos, sobre o comportamento nociceptivo.

Grupos	Soma de comportamento
Formalina 3% + Salina 0,9% (n=10)	227,03±7,98
Formalina 3% + SNAP 1200µg (ip) (n=5)	53,29±11,05 *
Formalina 3% + SNAP 1200µg (ct) (n=5)	216,438±13,556

*p<0,05 indica diferença significativa. Dados expressos como média±EPM.

Formalina 3%

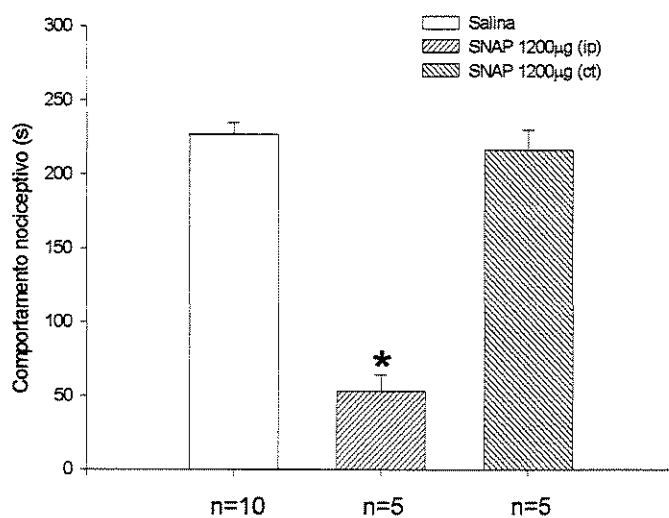


FIGURA 4 –Efeito da administração de SNAP na ATM ipsilateral à aplicação de formalina (3%) e na região da ATM contralateral de ratos sobre o comportamento nociceptivo (s). Cada coluna representa média±EPM. * $p < 0,05$ indica diferença significativa.

A co-administração periférica do doador de NO (SNAP) reduziu significativamente o comportamento nociceptivo induzido pela administração de formalina (3%) na ATM, de forma dose-dependente (**TAB.5** e **FIG.5**).

TABELA 5 – Valores médios da co-administração de diferentes concentrações de SNAP e formalina (3%) na região da ATM de ratos sobre o comportamento nociceptivo.

Grupos	Soma dos comportamentos (s)
Formalina 3%+SNAP 50µg (n=5)	142,48±13,76
Formalina 3%+SNAP 200µg (n=6)	80,36±6,56 *
Formalina 3%+SNAP 600µg (n=6)	64,22±2,55 *
Formalina 3%+SNAP 1200µg (n=5)	53,29±11,05 *

*p< 0,05 indica diferença significativa em relação ao grupo SNAP 50µg.
 Dados expressos como média±EPM.

Formalina 3% + SNAP

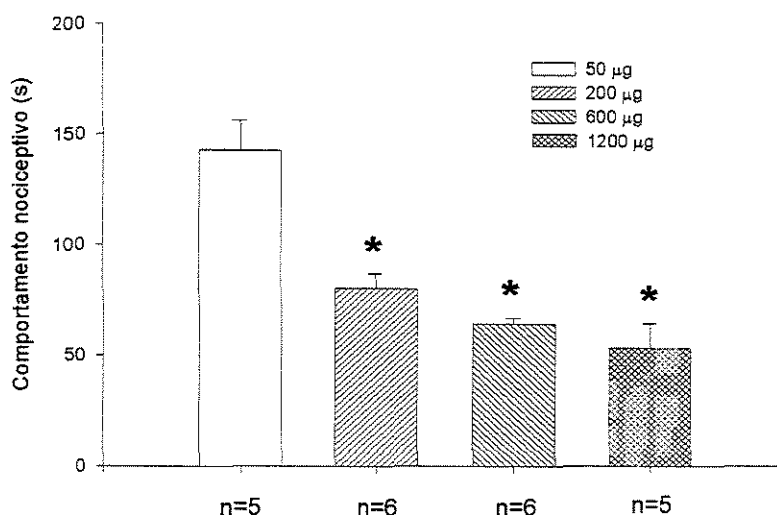


FIGURA 5 – Efeito da co-administração de diferentes concentrações de SNAP e formalina (3%) na região da ATM de ratos sobre o comportamento nociceptivo (s). Cada coluna representa média±EPM. * $p < 0,05$ indica diferença significativa em relação ao grupo SNAP 50µg.

4.3. - EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO PERIFÉRICA DO DOADOR DE NO (SIN-1) SOBRE O COMPORTAMENTO NOCICEPTIVO INDUZIDO PELA ADMINISTRAÇÃO DE FORMALINA NA ATM DE RATOS.

A administração de SIN-1 (1200µg) na ATM contralateral à administração de formalina (1,5%, 50µL) também não interferiu nas respostas comportamentais nociceptivas induzidas (**TAB.6**). A co-administração de SIN-1 (1200µg) e formalina (3%) induziu uma resposta significativa do comportamento nociceptivo em relação à salina e à sua aplicação na ATM contralateral (**FIG.6**).

TABELA 6 – Valores médios da administração de SIN-1 na ATM ipsilateral à aplicação de formalina (3%) na região da ATM contralateral de ratos sobre o comportamento nociceptivo.

Grupos	Soma de comportamentos (s)
Formalina 3% + salina 0,9% (n=10)	227,03±7,98
Formalina 3% + SIN-1 1200µg (ip) (n=5)	41.874±2.881*
Formalina 3% + SIN-1 1200µg (ct) (n=5)	219. 486±6.834

p<0,05 indica diferença. Dados expressos como média±EPM.

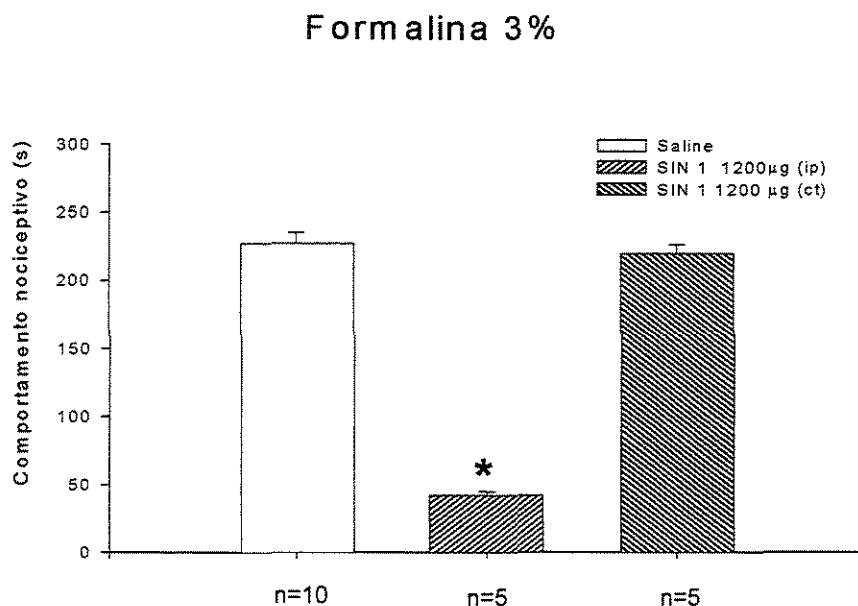


FIGURA 6 – Efeito da co-administração de SIN-1 na ATM ipsilateral à aplicação de formalina (3%) e na região da ATM contralateral, sobre o comportamento nociceptivo (s). Cada coluna representa média±EPM.

A co-administração periférica do doador de NO (SIN-1) também reduziu significativamente o comportamento nociceptivo induzido pela administração de formalina na ATM, de forma dose dependente (**TAB.7** e **FIG.7**).

TABELA 7 –Efeito da co-administração de diferentes concentrações de SIN-1 e formalina (3%) na região da ATM de ratos sobre o comportamento nociceptivo.

GRUPOS	Soma dos comportamentos (s)
Formalina 3% + SIN-1, 50µg (n=5)	132,13±21,60
Formalina 3% + SIN-1, 2000µg (n=5)	64,41±12,24 *
Formalina 3% + SIN-1, 600µg (n=5)	46,81±4,79 *
Formalina 3% + SIN-1, 12000µg (n=5)	41,87±2,88 *

*p<0,05 indica diferença significativa em relação ao grupo SIN-1 (50µg). Dados expressos como média.

Formalina 3% + SIN 1

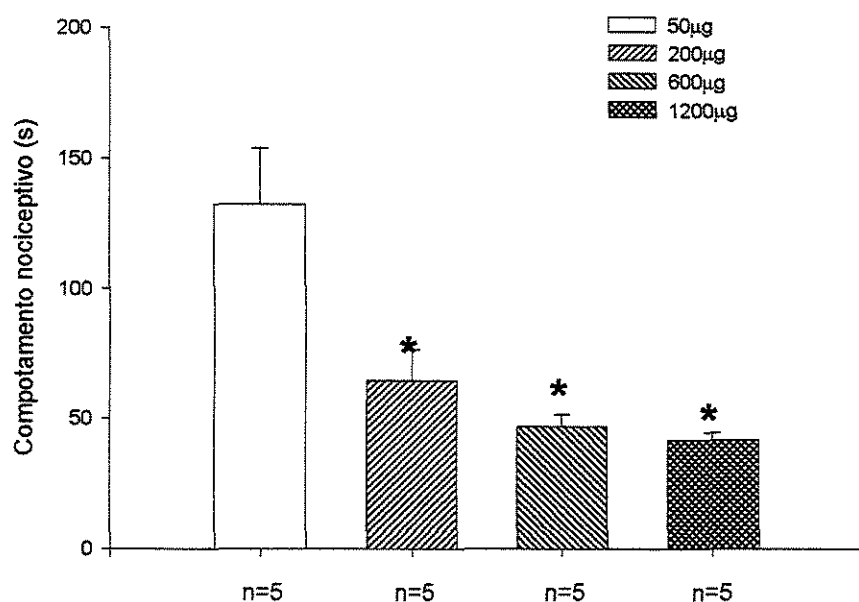


FIGURA 7 – Efeito da co-administração de diferentes concentrações de SIN-1 e formalina (3%) na região da ATM de ratos sobre o comportamento nociceptivo (s). Cada coluna representa média±EPM. * $p<0,05$ indica diferença significativa em relação ao grupo SIN-1 (50µg).

5. DISCUSSÃO

A dor é uma experiência subjetiva que corresponde a uma gama de situações, cujo elo comum está na natureza desagradável de sua percepção. Quanto à localização, a cabeça representa a região onde se manifesta uma grande parte desta sensação.

Para estudo dos mecanismos dolorosos, têm sido desenvolvidos modelos experimentais usando animais de laboratório, e para isso, vários agentes irritantes têm sido utilizados, com a finalidade de induzir processos dolorosos similares àqueles normalmente encontrados nas condições de dor clínica que acometem os seres humanos (REN & DUBNER, 1993).

No modelo desenvolvido por ROVERONI et al. (2001), as respostas comportamentais nociceptivas, caracterizadas pela exacerbação do ato de coçar a região orofacial e as caracterizadas pelo ato de levantar a cabeça, foram utilizadas como índice de dor orofacial para o teste da formalina na ATM de ratos, seja quando avaliado separadamente ou pela soma destas. Segundo ABBOTT et al. (1995) e TAYLOR et al. (1995), a simples soma de mais de um comportamento parece ser a forma mais adequada de avaliar as respostas comportamentais nociceptivas induzidas pela formalina na ATM de ratos, uma vez que pode haver uma interação entre os comportamentos. Os animais que

foram submetidos ao teste da formalina na ATM, emitiram comportamentos de coçar a região orofacial e de levantar rapidamente a cabeça, de forma alternada; ora coçando, ora levantando a cabeça e estes comportamentos, aparentemente se apresentavam de forma complementar. Diante disso, optamos neste trabalho, avaliar as respostas comportamentais nociceptivas conjuntamente, pela soma das mesmas.

O papel do NO na nocicepção é controverso, pois há autores que o relacionam com o aumento (YAMAMOTO et al., 1993; HOLTHUSEN & ARNDT, 1994) ou redução da dor (DUARTE, et al., 1990; DUARTE & FERREIRA, 1992); FERREIRA et al. 1991; BERRAZUETA, et al., (1993) sugerindo que a ação analgésica periférica da morfina se dá pela estimulação do sistema GMPc, após a liberação de NO.

O presente estudo mostrou que, quando o inibidor da NOS, L-NMMA, foi co-administrado com a formalina 3%, como nos estudos anteriores, este não promoveu alteração significativa no comportamento nociceptivo induzido.

Entretanto, quando o L-NMMA, nas concentrações de 150, 450 e 900 µg, foi co-administrado com formalina 0,5%, houve um aumento significativo das respostas comportamentais de maneira dose-dependente, sugerindo que o NO endógeno periférico possui um efeito antinociceptivo, evidenciando o envolvimento do NO periférico no sistema de modulação da dor proveniente de tecidos profundos como a ATM.

A administração do L-NMMA na ATM contralateral não alterou a sensibilidade dolorosa no teste da formalina, comprovando um efeito antinociceptivo local do L-NMMA neste experimento (BERRAZUETA et al., 1992). A especificidade do efeito produzido pela co-administração do L-NMMA na concentração de 900 µg com a formalina, foi demonstrada pela ineficácia da co-administração do seu isômero inativo D-NMMA, na mesma concentração, o qual não induziu alterações no teste comportamental

ROVERONI et al. (2001), demonstraram que a soma dos comportamentos nociceptivos desencadeados pela administração de formalina 2,5% e 5% não diferem significativamente entre si. A ausência de efeito analgésico do L-NMMA observada neste trabalho, quando se utilizou formalina 3%, pode estar relacionada ao fato de que, em alta concentração, a formalina induz respostas comportamentais num patamar máximo, o que poderia ter mascarado um possível efeito analgésico do inibidor do NO endógeno.

Evidências sobre o efeito antinociceptivo do NO são atribuídas às seguintes observações: sabe-se que a acetilcolina (Ach) provoca a liberação de NO das células endoteliais e que a administração local de Ach antagoniza as prostaglandinas E2 (PGE2) e a hiperalgesia na pata de ratos induzida pela carragenina (DUARTE et al., 1990); os agentes que sintetizam o NO (nitroprussiato sódico, nitroglicerina e o SIN-1) antagonizam a hiperalgesia causada por carragenina e PGE2, sendo os efeitos desses agentes bloqueados pelo Azul de metileno; durante a inflamação experimental

(carragenina) a administração de L-arginina produz antinocicepção, a qual é inibida por inibidores da NOS (L-NMMA e L-NIO) (DUARTE, et al., 1990; FERREIRA, et al., 1991).

Por outro lado, a co-administração do doador de NO, SNAP, nas concentrações de 50, 200, 500 e 1200 µg, com a formalina na ATM de ratos, reduziram de maneira dose-dependente o número de comportamentos nociceptivos, caracterizados pelo ato de levantar rapidamente a cabeça e coçar a região orofacial, conjuntamente avaliados pela soma dos mesmos, comprovando o envolvimento do NO no mecanismo de dor periférica, evidenciando um efeito analgésico do doador exógeno de NO, SNAP.

O doador periférico de NO, SNAP, na maior concentração utilizada (1200 µg), quando administrado na ATM contralateral à administração de formalina, não alterou o comportamento nociceptivo induzido, descartando um possível efeito sistêmico na ação analgésica desencadeada pelo SNAP, administrado na ATM ipsilateral.

Da mesma forma, a co-administração do doador de NO, SIN-1, nas concentrações de 50, 200, 600 e 1200 µg com a formalina na ATM de ratos, também reduziram de maneira dose-dependente as respostas comportamentais nociceptivas desencadeadas por este agente, demonstrando também um efeito antinociceptivo do NO exógeno.

A administração do SIN-1 (1200 µg) na ATM contralateral não alterou a sensibilidade dolorosa, comprovando também seu efeito analgésico local, quando co-administrado com a formalina na ATM ipsilateral.

SOUZA & PRADO (2001) apontam que o SIN-1 reduz a dor por um mecanismo espinhal que envolve a ativação da guanilato-ciclase e que os efeitos do SIN-1 variam, dependendo da dose e do modelo de dor utilizado. Embora, este tenha um efeito importante na antinocicepção, altas doses deste doador de NO podem intensificar a sensibilidade dolorosa.

Entretanto, neste modelo comportamental, mesmo na concentração de 1200 µg, o SIN-1 teve um efeito analgésico.

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que os doadores de NO, SNAP e SIN, antagonizam a hiperalgesia causada pela formalina.

Uma das características da resposta comportamental induzida pela formalina, é seu padrão bifásico, porém, na metodologia aplicada no presente estudo, não foi possível observar as respostas comportamentais emitidas durante a primeira fase, pois nesse período, os animais ainda apresentavam um leve efeito residual da inalação de Halotano. Por se tratar de tecido profundo e de difícil acesso, a administração de formalina na ATM de ratos sem indução anestésica é inviável. Além do que, o animal seria submetido a uma situação de estresse de grande intensidade e desnecessária. O estresse, por si

só, já constituiria uma variável importante, podendo alterar a sensibilidade à dor (CLAVELOU et al., 1989).

Os receptores da dor podem ser sensibilizados por várias substâncias químicas, incluindo substância P, PGE₂, glutamato, serotonina, noradrenalina, encefalinas, endorfinas e histamina (RUMORE & SCHLICHTING, 1985).

A primeira fase do teste da formalina tem sido atribuída a um efeito direto de substâncias algógenas sobre os nociceptores, enquanto que a segunda fase tem sido associada ao subsequente desenvolvimento da inflamação (HUNSKAAR & HOLE, 1987) e sensibilização central.

Embora a segunda fase do teste da formalina tenha sido muito utilizada como um modelo de estudo do processo de sensibilização central (CODERE & MELZACK, 1992; CADET, et al., 1993), tem sido proposto que apenas a sensibilização central não é suficiente para manter a segunda fase de resposta (DALLEL, et al., 1995; TAYLOR, et al., 1995).

Os resultados deste trabalho confirmam a importância dos mecanismos periféricos na segunda fase do teste da formalina, uma vez que a co-administração do doador de NO (SNAP e SIN-1) reduziu significativamente a resposta nociceptiva induzida pela administração de formalina na região da ATM de ratos (FIG. 4 e 6).

A administração local do inibidor do NO endógeno (L-NMMA) aumentou significativamente o comportamento nociceptivo, sugerindo que o NO endógeno periférico possui um efeito antinociceptivo. Como a administração, tanto do doador de NO (SNAP e SIN-1), como do inibidor da enzima NOS (L-NMMA) na ATM contralateral à administração de formalina não alterou a sensibilidade dolorosa, foi descartada a possibilidade de um efeito sistêmico desses agentes.

Segundo FERREIRA et al. (1991), o papel do NO no mecanismo de analgesia é medido pela ativação da via L-arginina/NO/GMPc, e que o aumento de GMPc ao nível dos nociceptores, é um fator importante no sistema de modulação dolorosa. Tem sido demonstrado que a administração local de L-arginina produz antinocicepção em ratos com hiperalgesia induzida pela carragenina e que esse efeito pode ser bloqueado por inibidores da síntese de NO (DUARTE et al., 1990).

No teste da formalina na pata de ratos, o L-NMMA também reduz o efeito antinociceptivo de um metabólito da L-arginina, o agmatine (ÖNAL & SOIKAN, 2001). Os resultados obtidos neste experimento, utilizando o teste da formalina na ATM, são concordantes com os obtidos em outros modelos de dor, como na hiperalgesia induzida por carragenina e prostaglandina, onde a administração local de doador de NO também produziu antinocicepção (FERREIRA et al., 1991).

Entretanto, nossos dados diferem dos resultados obtidos por CHEN & LEVINE (1999), quando relacionaram o NO periférico à nocicepção, demonstrando que o L-NMMA antagoniza a hiperalgesia por PGE₂ no teste de sensibilização mecânica.

GRANADOS-SOTO et al. (1997), utilizando o teste da formalina na pata de ratos, demonstraram que a administração local de morfina induz nocicepção como resultado da ativação da via Arginina/NO/GMPc. Por outro lado, HALEY et al. (1992), têm sugerido que a via Arginina/NO/GMPc tem um papel hiperalgésico maior que o efeito antinociceptivo periférico. KAWABATA et al. (1994) demonstraram um efeito nociceptivo da via Arginina/NO/GMPc na dor induzida pela bradicinina, SP e carragenina. Provavelmente, essas aparentes contradições se devem ao fato de que a via Arginina/NO/GMPc pode ter diferentes funções, dependendo do tipo de estímulo nociceptivo envolvido e da participação de diferentes tipos de neurônios sensoriais primários ativados.

De qualquer forma, o NO pode ser considerado um importante modulador de várias desordens inflamatórias agudas e crônicas (LAROUX, et al., 2000). Apesar da alta incidência de condições dolorosas associadas ao comprometimento da ATM, o conhecimento limitado sobre os mediadores químicos envolvidos nessas condições e a falta de modelos experimentais apropriados para o estudo da mesma, tem gerado grandes controvérsias a respeito do tratamento mais adequado para esses casos.

Nossos resultados evidenciam o envolvimento do NO periférico na resposta dolorosa, desencadeada pela administração de formalina na ATM de ratos, sugerindo um possível papel terapêutico do NO na dor proveniente de tecidos profundos, como a ATM.

6. - CONCLUSÃO:

Com base na metodologia empregada, os resultados deste estudo permitem fazer as seguintes considerações:

- O Óxido Nítrico modula (tem efeito antinociceptivo) a resposta comportamental nociceptiva induzida pela formalina na ATM de ratos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABBOTT, F.V., FRANKLIN, K.B.J., WESTBROOK, R.F. The formalin test: scoring properties of the first and second phases of the pain response in rats. **Pain**, Amsterdam, v.60, n.1, p.91-102, Jan. 1995.
2. AGHABEIGI, B. The pathophysiology of pain. **Br Dent J**. London, v.173, n.3, p.91-96, Aug. 1992.
3. ALCARAZ M.J.; GUILLEN M.L. The nitric oxide related therapeutic phenomenon: a challenging task. **Curr Pharm Des** v.8, n.3 p.21-31, Feb 2002.
4. ALDER, M.E. et al. Magnetic resonance spectroscopy of inflammation associated with the temporomandibular joint. **Oral Maxillofacial Radiology**, v.74, p.512-523, 1992.
5. AMIN A.R., DICESARE P.E., VYAS P. et al. The expression and regulation of nitric oxide synthase in human osteoarthritis affected chondrocytes: Evidence for up-regulated neuronal nitric oxide synthase. **J Exp Med**, v. 182, p.2097, 1995.
6. ANBAR M, GRATT B.M. The possible role of nitric oxide in the physiopathology of pain associated with temporomandibular joint disorders. **J Oral Maxillofac Surg**. Philadelphia, v. 56, p. 872-882, 1998.
7. BERRAZUETA, J.R. et al. (personal communication) apud FERREIRA S.H, LORENZETTI B.B. & FACCILOLO I. H. Blockade of hyperalgesia and neurogenic oedema by topical application of nitroglycerin. **Eur Journal of Pharmacology**. Amsterdam, v.217, p 207-209, 1992.

8. BERRAZUETA, J.R. et al. The peripheral analgesia actino of the exogenous nitric oxide donor; nitroglicerín. A placebo-controlled study of the transdermal action of nitroglycerin on pain sensitivity in the forearm. **Rev Esp Card** v.46, n1; p. 10-4. Jan, 1993.
9. BING, R.J.; LOMNICKA, M. Why do cyclo-oxygenase-2 inhibitors cause cardiovascular events. **J Am Coll Cardiol**, Vol.6, n.39, p. 521-2. Feb 2002.
10. CADET, R., AIGOUY, L., WODA, A. Sustained hiperalgesia can be induced in the rat by a single formalin injection and depends on the initial nociceptive inputs. **Neurosci Lett**, Limerick, v.156, n.1-2, p.43-46, June 1993.
11. CHEN, X. & LEVINE, J.D. NOS inhibitor antagonism of PGE2-induced mechanical sensitization of cutaneous C-fiber nociceptores in the rat. **J Neurophysiol**. Bethesda, v.81 n 3: p. 963-6 Mar. 1999.
12. CLAVELOU, P. et al. Application of the formalin test to the study of orofacial pain in the rat. **Neurosci Lett**, Limerick, v.103, n.3, p.349-353, Sept. 1989.
13. CLAVELOU, P. et al. The orofacial formalin test in rats: effects of different formalin concentrations. **Pain**, Amsterdam, v.62, n.3, p.295-301, Sept. 1995.
14. CODERRE, T.J., VACCARINO, A.L., MELZACK, R. Central nervous system plasticity in the tonic pain response to subcutaneous formalin injection. **Brain Res**, Amsterdam, v.535, n.1, p.155-158, Dec. 1990.

15. CODERRE, T.J., MELZACK, R. The contribution of excitatory amino acids to central sensitization and persistent nociception after formalin-induced tissue injury. **J Neurosci**, New York, v.12, n.9, p.3665-3670, Sept. 1992.
16. CODERRE, T.J. et al. Contribution of central neuroplasticity to pathological pain: review of clinical and experimental evidence. **Pain**, Amsterdam, v.52, n.3, p.259-285, Mar. 1993.
17. CODERRE, T.J. & YASHPAL, K. Intracellular messengers contributing to persistent nociception and hyperalgesia induced by l-glutamate and substance P in the rat formalin pain model. **European Journal of Neuroscience**. Oxford, v. 6, p. 1328-1334. 1994.
18. COOPER, S.A. Treating acute pain: do's and don'ts, pros and cons. **J. Endod**, Baltimore, v.16, n.2, p.85-91, Feb. 1990.
19. CROSBY, G., MAROTA, J.J., HUANG, P.L. Intact nociception-induced neuroplasticity in transgenic mice deficient in neuronal nitric oxide synthase. **Neuropharmacology**, Oxford, v. 33, n.11; p. 1487-97, Nov 1994.
20. DALLEL, R. et al. Evidence for a peripheral origin of the tonic nociceptive response to subcutaneous formalin. **Pain**, Amsterdam, v.61, n.1, p.11-16, Apr. 1995.
21. DAO, T.T.T. et al. Modulation of myofascial pain by the reproductive hormones; a preliminary report. **The Journal of Prost Dent**. Orlando, v. 79, n 6, 665-70, jun, 1998.
22. DICKENSON, A.H. Central acute pain mechanisms. **Ann Med**. v. 27, p.223, 1995.

23. DRAPIER, J.C.; WEIZESBIN, J. & HIBBS, J.B. Interferon gamma and tumor necrosis factor induce the L-arginine cytotoxic effects or mechanism in murine macrophages. **Eur J Immun.** Weinheim, v. 18, p. 1587-92, 1988.
24. DUARTE, I.D.G. et al., Peripheral analgesia and activation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway. **Eur J Pharmacology.** Amsterdam, v. 186, p.289-93, 1990.
25. DUARTE, I.D. & FERREIRA, SH. The molecular mechanism of central analgesia induced by morphine or carbachol and the L-arginine-nitric oxide-cGMP pathway. **Eur J Pharmacol.** Amsterdam, v.6; n. 2211 p. 171-4. Oct 1992.
26. DUBNER, R. Pain control in dentistry: the anatomic and physiologic basis of orofacial pain. **Pain,** Amsterdam, v.8, n.6, p.408-416, June 1986.
27. DUBNER, R. & BENET, G.J. Spinal and trigeminal mechanisms of nociception. **Annu. Rev. Neurosc.** v. 6, p.381-418, 1993.
28. DUBUISSON, D. & DENNIS, S.G. The formalin test: a quantitative study for the analgesic effect of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain.** Amsterdam, v. 4, p. 161-174, 1977.
29. FERREIRA, S.H.; DUARTE, I.D.G.; LORENZETTI, B.B. The molecular mechanism of action of peripheral morphine analgesia: Stimulation of the cGMP system via nitric oxide release. **Eur J Pharmacol.** Amsterdam, v.201, p.121, 1991.

30. FERREIRA, S.H.; LORENZETTI, B.B. & FACCILOLO, I.H. Blockade of hyperalgesia and neurogenic oedema by topical application of nitroglycerin. **Eur Journal of Pharmacology**. Amsterdam v.217, p.207-209, 1992.
31. FILLINGIM, R.B. et al. Generalized vibrotactile allodynia in a patient with temporomandibular disorder. **Pain**. Amsterdam, v. 78, n.1 p.75-8, Oct 1998.
32. FLORA FILHO, R. & ZILBERSTEIN, B. Óxido Nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Rev. Assoc Méd Bras**. São Paulo, v.46, n.3, jul/set 2000.
33. FUKUTO, J.M. Chemistry of N-hydroxy-L-arginine. **Methods Enzymol**. Orlando, v.268 p.365-75. 1996.
34. FURCHGOTT, R.F. & ZAWADZKI, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature** London, v. 288, n.5789 p.373-6. Nov. 1980.
35. GAD, M.Z. & KHATAB, M., Modulation of nitric oxide synthesis in inflammation. Relationship to oxygen-derived free radicals and prostaglandin synthesis. **Arsneimittelforschung**, v. 50, n.5 p.449-55, May, 2000.
36. GORDH, T.; KARLSTEN, R.; KRISTENSEN, J. Intervention with spinal NMDA, adenosine and NO system for pain modulation. **Ann Med**. London, v.27, p. 229, 1995.
37. GRANADOS-SOTO, V. et al. evidence for the involvement of the nitric oxide-cGMP pathway in the antinociception of morphine in the formalin test. **Eur Journal of Pharmacology**. Amsterdam, v. 340, p.177-80, Oct 1997.

38. GUHRING, H. et al. Role of nitric oxide in zymosan induced paw inflammation and thermal hiperalgesia. **Inflamm Res.** Basel, v. 50, n.2 p.83-8. Feb, 2001.
39. HALEY, J.E.; WILCOX, G.L. & CHAPMAN, P.F. The role of nitric oxide in hippocampal long-term potentiation. **Neuron.** Cambridge, v. 8, n.2 p. 211-6 Feb. 1992.
40. HALEY, J.E. Gases as neurotransmitters. **Essays Biochem.** Essex, v.33 p.79-91. 1998.
41. HAHATHAWAY, C.B., HU, J.W., BEREITER, D.A. Distribution of Fos-like immunoreactivity in the caudal brainstem of the rat following noxious chemical stimulation of the temporomandibular joint. **J Comp Neur**, New York, v.356, n.3, p.444-456, June 1995.
42. HIDETAKA, H. et al. Immunohistochemical localization of inducible nitric oxide synthase in sinovial tissue of human temporomandibular joints with internal derangement. **Archives of Oral Biology.** Oxford, v. 46 p.93-97, 2001.
43. HOLTHUSEN, H. & ARNDT, J.O. Nitric oxide evokes pain in humans on intracutaneous injection. **Neurosci Lett.** v.165, p. 71, 1994.
44. HU, J.M. Response properties of nociceptive and non-nociceptive neurons in the rat's trigeminal subnucleus caudalis (medullary dorsal horn) related to cutaneous and deep craniofacial afferent stimulation and modulation by diffuse noxious inhibitory controls. **Pain.** Amsterdam, v.41, n.3, p.331-45; Jun 1990.

45. HU, J.M. et al. Electromiographic and trigeminal brainstem neuronal changes associated with inflammatory irritation of superficial and deep craniofacial tissues in rats. In: **World Congress on Pain, Progress in Pain Research and Management**, 7. Proceedings. v.2, 1994.
46. HU, J.M. et al. Deep craniofacial pain: involvement of trigeminal subnucleus caudalis and its modulation. In: **Word Congress on Pain, Progress in Pain Research and Management**, 8. 1997. Proceedings. v.8, 1997.
47. HUNSKAAR, S. & HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, Amsterdam, v.30, n.1, p.104-114, July 1987.
48. HUOPANIEMI, F. et al. Response characteristics of tooth pulp-driven postsynaptic neurons in the spinal trigeminal subnucleus oralis of the cat. **Acta Physiol Scand**. Oxford, v.144, n. 2, p. 177-83, Feb; 1992.
49. IADECOLA, C. Regulation of the cerebral microcirculation during neural activity: Is nitric oxide the missing link? **Trends Neurosci**. v.16, p.206-214, 1993.
50. IGOR, D.G.; DOS SANTOS, I.R.; LORENZETTI, B.B. et al. Analgesia by direct antagonism of nociceptor sensitization involves the arginine nitric oxide-c-GMP pathway. **Eur J Pharmacol**. Amsterdam, v. 217, p.225, Jul 1992.
51. IRVING et al. Does temporomandibular disorder pain dysfunction syndrome affect dietary intake? **Dent Update**. Millfields Plymouth, v. 26, n.9 p.405-7. Nov. 1999.

52. KAWABATA, A.; MANABE, S.; MANABE, Y.; TAKAGI, H. Effect of topical administration of L-arginine on formalin-induced nociception in the mouse: a dual role of peripherally formed NO in pain modulation. **Br J Pharmacol**. London, v. 112, n.2, p. 547-50, 1994.
53. LAROUX, F.S. et al. Role of nitric oxide in the regulation of acute and chronic inflammation. **Antioxid Redox Signal Fall**; v.2 n3 p.391-6 Review, 2000.
54. LAWAND, N.B.; WILLIS, W.D & WESTLUND, K.N. Blockade of joint inflammation and secondary hyperalgesia by L-NAME, a nitric oxide synthase inhibitors. **Neuroreport**. Philadelphia, v.3, n.8 p.895-9, Mar 1997.
55. LOWENSTEIN, C. et al. A nitric oxide inhibits viral replication in myocarditis. **Circulation**, v.88, 1993.
56. MACARI, M. **A Influência da Postura de Cabeça e Pescoço nas Disfunções do Sistema Estomatognático**. Piracicaba, 2000. 44f. Monografia (Especialização em Prótese Dental) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.
57. MACHELSKA, H. et al. Inhibition of nitric oxide synthase enhances antinociception mediated by mu, delta and kappa opioid receptors in acute and prolonged pain in the rat spinalcord. **J Pharmacol Exp Ther**. Bethesda, v.282 n. 2 p.977-84. Aug; 1997.
58. MACHELSKA, H.; PRZEWLOCKI, R.; RADOMSKI M.W., PRZEWLOCKA, B. Differential effects of intrathecally and intracerebroventricularly administered nitric oxide donors on noxious mechanical and thermal stimulation. **Pol J Pharmacol**, Poland, v.50, n.6, p.407-415, 1998.

59. McCARTNEY-FRANCIS, N.L. et al. Selective inhibition of inducible oxide synthase exacerbates erosive joint disease. **J Immunol.** Bethesda, v. 15 v. 166 p.2734-40 Feb 2001.
60. MERSK, Y. H. Classification of the cronic pain: syndromes and definition of pain terms. **Pain**, Amsterdam, v.3, p.51, 1986. [Suppl.]
61. MIAMPAMBA, M. et al. Inflammation of the colonic wall induced by formalin as a model of acute visceral pain. **Pain**, Amsterdam, v.57, p.327-334, 1993.
62. MILLAN, M.J. The induction of pain: an integrative review. **Prog Neurobiol.** Oxford, v. 57, n.1, p.1-164, Jan 1999.
63. MJELLEM-JOLY, N. et al. Intratecal co-administration of substance P and NMDA augments nociceptive responses in the formalin test. **Pain**, Amsterdam, v.51, n.1, p.195-198, Nov. 1992.
64. MONCADA, S. et al., Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol. Rev.** v. 43, p.109-142, 1991.
65. MUNGLANI, R.; HUNT, S.P. Molecular biology of pain. **Brit. J. Anaesth.**, London, v.75, p.186-192, 1995.
66. MURRELL, G.A.C.; DOLAN, M.M. & JANG, D. Nitric oxide: An important articular free radical. **J. Bone Surg.**, v. 78, p. 265, 1996.
67. NAKAMURA, A.; FUJITA, M. & SHIOMI, H. Involvement of endogenous nitric oxide in the mechanism of bradikinin-induced peripheral hiperalgesia. **Br J Pharmacol.** London, v.117, n.3, p.407-12. Feb 1996.

68. NOZAKI-TAGUCHI, N. & YAMAMOTO, T. Involvement of nitric oxide in peripheral antinociception mediated by kappa and delta opioid receptors. **Anesth Analg**, v.87, n.2, p.388-93, 1998.
69. ÖNAL, A. & SOIKAN, N. Agmatine produces antinociception in tonic pain in mice. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v.69, n1-2 p. 93-97, May-Jun;2001.
70. PALMGREN, J. et al. Immunohistochemical demonstration of sensory and autonomic nerve terminals in herniated lumbar disc tissue. **Spine**; Philadelphia, v.21, p.1301-06, 1996.
71. PAUL-CLARK, M.J. et al. Nitric oxide synthase inhibitors have opposite effects on acute inflammation depending on their route of administration. **J Immunol**. Bethesda, v.166, n.2, p.1169-77. Jan 2001.
72. PARADA, C.A.; LUCCARINI, P. & WODA, A. Effect of an NMDA receptor antagonist on the wind-up neurons in the trigeminal oralis subnucleus. **Brain Res**, Amsterdam, v.761, n.1, p.313-320, July 1997.
73. PARADA, C.A.; TAMBELI, C.H. & FERREIRA, S.H. Peripheral histamine H₁ receptors but not bradykinin B₁ and B₂ receptors are involved in the second phase of the formalin test in rats. In: **World Congress on Pain, Progress in Pain Research and Management**, 9. 1999. Viena. Anais. Viena, p. 34, 1999.
74. QUEIROZ, S.L. & BATISTA, A.A. Funções Biológicas do Óxido Nítrico. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 22, n 4, Jul/Ag 1999.

75. RABOISSON, P.; DALLEL, R.; CLAVELOU, P.; SESSLE, B.J.; WODA, A. Effects of subcutaneous formalin on the activity of trigeminal brain stem nociceptive neurons in the rat. **J Neurophysiol.** Bethesda , v. 73, n.2, p. 496-505, 1995.
76. REN, K. & DUBNER, R. NMDA receptor antagonists attenuate mechanical hyperalgesia in rats with unilateral inflammation of the hind paw. **Neurosci Lett.** Limerick, v.26, n.163(1), p.22-6. Nov 1993.
77. ROCHE A.K.; COOK, M.; WICOX, G.L.; KAJANDER, K.C. A nitric oxide synthesis inhibitor (L-NAME) reduces licking behavior and FOS-labeling in the spinal cord of rats during formalin-induced inflammation. **Pain.** Amsterdam, v.2-3, p. 331-41, 1996.
78. ROSLAND, J.H. et al. The formalin test in mice: effect of formalin concentration. **Pain**, Amsterdam, v.42, n.2, p.235-242, Aug. 1990.
79. ROSLAND, J. H. The formalin test in mice: the influence of ambient temperature. **Pain.** Amsterdam , v. 45, n. 2, p. 2111-216, 1991.
80. ROVERONI, R. C. et al. Development of a behavioral model of TMJ pain in rats: the TMJ formalin test. **Pain.** Amsterdam, v.94n.2, p.185-91. Nov. 2001.
81. RUMORE, M.M. & SCHLICHTING, D.A. Analgesic effects of antihistaminics. **Life Sci.** Oxford, v.36, n.5, p.403-416, Feb. 1985.
82. SADLER, T.W. **Langman – Embriologia Médica** 7ª ed. P. 233. Ed. Guanabara Koogan S.A Rio de Janeiro/ RJ, 1997.
83. SCHMIDT, H.H.H.W. & WALTER, U. NO at work. **Cell.** Cambridge, v. 78, p. 919-925, 1994.

84. SEMOS, M.L. & HEADLEY, P.M. The role of nitric oxide in spinal nociceptive reflexes in rats with neurogenic and non-neurogenic peripheral inflammation. **Eur J Neurosci**. Oxford, v.1, n.6(8), p.1328-34, Aug, 1994.
85. SESSLE, B.J. Brainstem mechanisms underlying craniofacial pain and its modulation. **Adv Pain Res Ther**. Philadelphia, v.22, p.413-421, 1995.
86. SOUSA, A M. & PRADO, W.A., The dual effect of a nitric oxide donor in nociception. **Brain Res**. Amsterdam , v. 6, n.897 (1-2), p.9-19, April 2001.
87. STUEHR, D. J. & MARLETTA, M.A. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite in response to Escherichia coli lipopolysaccharide. **Proc Natl Acad Sci**. Washington, v.82, p.7738-7742. 1985.
88. SUZUKI, Y. et al. Antinociceptive mechanism of Gosha-jinki-gan in streptozotocin-induced diabetic animals: role of nitric oxide in the periphery. **JPN J Pharmacol**. Tókió, v. 79, n.3, p.387-91. Mar 1999.
89. SWIFT, J.Q. et al. Effect of intra-articular versus systemic anti-inflammatory drugs in a rabbit model of temporomandibular joint inflammation. **J Oral Maxillofac Surg**, Philadelphia, v. 56, n.11, p.1288-95. Nov. 1998.
90. TAKAHASHI, T.; KONDO, T.; KAMEI, K. et al. Elevated levels of nitric oxide in synovial fluid from patients with temporomandibular disorders. **Oral Med Oral Pathol**. Copenhagen, v. 82, p. 505, 1996.

91. TAMBELI, C. H.; TSAI, C. M.; HU, J. W.; SESSLE, B. J. Central opioid modulation of mustard oil-evoked jaw muscle activity (abstract). **J. Dent. Res.** (Special Iss) p. 76-17, 1997.
92. TAYLOR, B.K.; PETERSON, M.A. & BASBAUM, A.I. Persistent cardiovascular and behavioral nociceptive responses to subcutaneous formalin require peripheral nerve input. **J Neurosci**, New York, v.15, n.11, p.7575-7584, Nov. 1995.
93. TENG, C. J. & ABBOTT, F.V. The formalin test: a dose response analysis at three developmental stages. **Pain**. Amsterdam, v.76, p.337-47.1998.
94. THOMPSEN, L.L. et al. Effect of a nitric oxide donor (glyceryl trinitrate) on nociceptive thresholds in man. **Cephalgia** v.16, n.3, p.169-74. May, 1996
95. TJOLSEN, A. et. al., The formalin test: An evaluation of the method. **Pain**. Amsterdam, v.51, n.1, p.5-17, Oct 1992.
96. TSAI, C.M. et al., Involvement of trigeminal subnucleus caudalis (medullary dorsal horn) in craniofacial nociceptive reflex activity. **Pain**. Amsterdam, v.81, n.1-2, p115-28. May 1999.
97. VON KORFF, M. Health services researches and temporomandibular pain, in Sessle BJ, Bryant PS, Dionne RA (eds): Temporomandibular disorders and Related Pain: Progress in Pain Research and Management, **IASP Press**, v.4, p. 227-236. Seattle, 1995.
98. YAMAMOTO, T.; SHIMOYAMA, N., & MIZUGUCHI, T. Nitric oxide synthase inhibitor blocks spinal sensitization induced by formalin injection into the rat paw. **Anesth Analg**, v.77, n.5, p.886-90, 1993.

- 99.YU, X.M.; Sessle, B.J.; Hu, J.W. Differential effects of cutaneous and deep application of inflammatory irritant on mechanoreceptive field properties of trigeminal brain stem nociceptive neurons. **J Neurophysiol**, Bethesda, v.70, n.4, p.1704-1707, Oct. 1993.
- 100.YU, X.M. et al. Effects of inflammatory irritant application to the rat temporomandibular joint on jaw and neck muscle activity. **Pain**, Amsterdam, v.60, n.2, p.143-149, Feb. 1994.
- 101.ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigation of experimental pain in conscious animals. **Pain**. Amsterdam, v. 16, n.2, p.109-10. Jun 1983.

ANEXO 1 :

Ficha utilizada para quantificar as respostas comportamentais, induzidas pela administração de formalina na região da ATM de ratos, durante o período de observação de 45 minutos.

DATA: / /

HORÁRIO:

GRUPO:

PESO: g

	0-3	3-6	6-9	9-12	12-15	15-18	18-21	21-24	24-27	27-30	30-33	33-36	36-39	39-42	42-45
CO															
LC															

CO: comportamento de coçar a região orofacial (segundos)

LC: comportamento de levantar rapidamente a cabeça (número de vezes)

OBSERVAÇÕES:

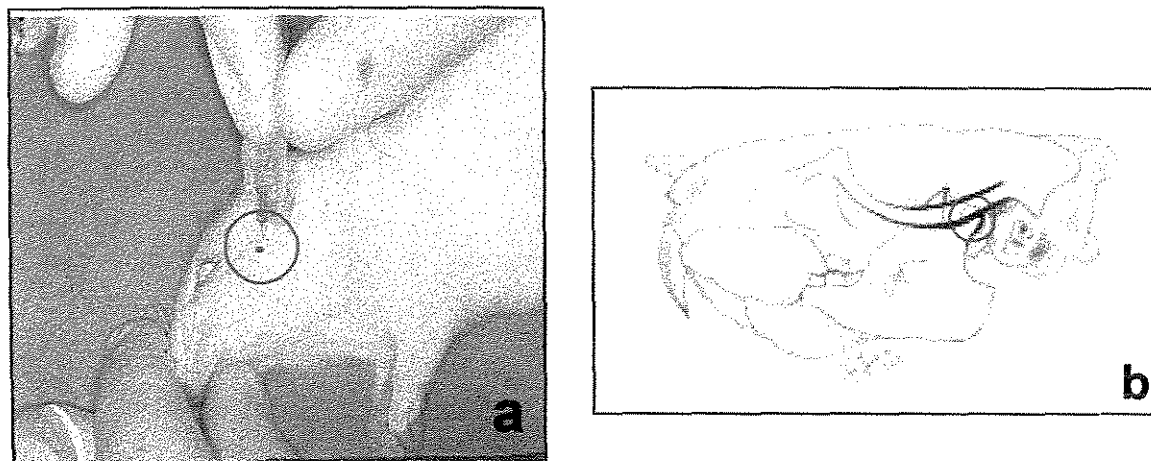


FIG. 8 - ADMINISTRAÇÃO DA DROGA NA ATM DO ANIMAL.

a) Administração da droga na ATM do animal, com uma agulha hipodérmica calibre 30, que foi conectada a uma seringa de microlitro Hamilton, por meio de uma cânula de polietileno P50.

b) Desenho esquemático mostrando o local de inserção da agulha.

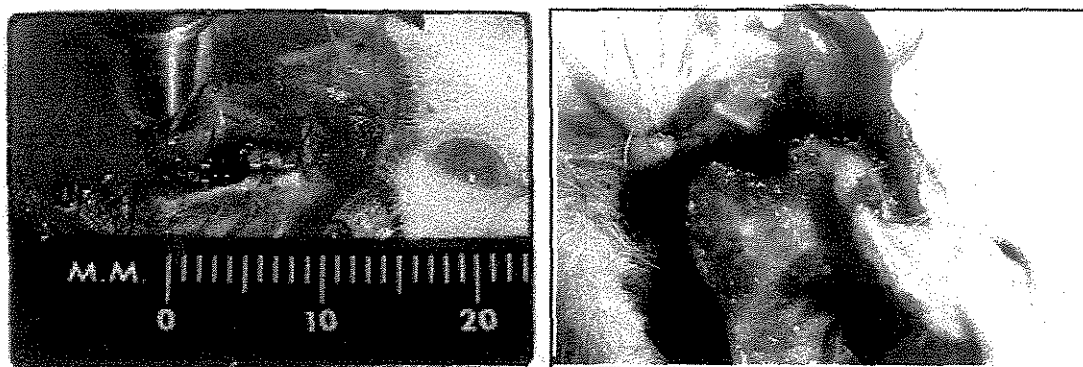


FIG. 9 – IDENTIFICAÇÃO VISUAL DO SÍTIO DE INJEÇÃO DA DROGA. As figuras acima mostram a região da ATM de rato dissecada, confirmando o sítio de injeção da droga (região periarticular, principalmente o côndilo) corado pelo Azul de Evans.



ANEXO 3 **Comissão de Ética na Experimentação Animal**
Instituto de Biologia
Universidade Estadual de Campinas
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 137-1, sobre "O Papel do óxido nítrico endógeno perfúrico na resposta comportamental nociceptiva induzida pela administração de formilina na ATM de rato" sob a responsabilidade de MARCELO MACARI - Fisiologia

..... está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 18/07/2000. Este certificado expira em 17/07/2001

Campinas, 18 de julho de 2000

CERTIFICATE

We certify that the work described in the manuscript ".....", is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the Institute of Biology/UNICAMP Ethics Committee for Animal Research (CEEA) on/...../....., protocol nº This certificate expires on...../...../.....

Campinas/...../.....

Albino
Prof(a) Dr(a) Alba R. M. Souza Brito
Presidente – CEEA/IB/UNICAMP

Amândeo Ferraz - SGA
Prof(a) Dr(a)
Secretário(a) – CEEA/IB/UNICAMP

APÊNDICE

Tabelas suplementares dos resultados individuais da amostra

TABELA 1

Valores individuais da co-administração de L-NMMA (900µg) com formalina 3% na resposta nociceptiva.

Rato	Formalina 3% +Salina	Formalina 3% +LNMMA
1	248.09	218.98
2	248.07	279.14
3	267.60	211.69
4	182.93	226.01
5	233.90	
6	198.28	
7	220.45	
8	235.76	
9	211.31	
10	223.87	
Media±epm	227.026±7.977	233.955±15.343

Não há diferença entre os grupos ($p>0,05$; teste Tukey).

TABELA 2

Valores individuais da co-administração de L-NMMA com formalina 0,5% na resposta nociceptiva.

Rato	Formalina 0,5% +Salina	Formalina 0,5% +LNMMA (ATM ipsilateral)	Formalina 0,5% +LNMMA (ATM contralateral)	Formalina 0,5% +DNMMA
1	107.88	443.06	118.29	52.10
2	61.41	147.98	74.55	59.89
3	77.65	300.18	52.60	79.47
4	64.74	253.57	86.46	60.76
5	39.55	118.58	73.49	61.25
6	106.69	181.49	79.65	
Media±epm	76.317±10.998	240.81±48.877 *	80.84±8.806	62.694±4.513

* ($p<0,05$; teste Tukey) indica uma diferença significativa entre os grupos.

TABELA 3

Valores individuais do aumento da concentração do L-NMMA na resposta nociceptiva induzida pela formalina 0,5%.

Rato	Formalina 0,5% +LNMMA 150	Formalina 0,5% +LNMMA 450	Formalina 0,5% +LNMMA 900
1	110.62	116.85	443.06
2	105.67	161.44	147.98
3	85.74	129.15	300.18
4	226.48	102.08	253.57
5	49.55	121.80	118.58
6	98.42	183.59	181.49
7	110.52		
8	29.00		
9	91.95		
10	39.33		
Media±epm	94.728±17.484	135.818±12.487	240.81±48.877 *

* (p<0,05; teste Tukey) indica uma diferença significativa do 150ug.

Tabela 4

Valores individuais da aplicação do SNAP na ATM, na resposta nociceptiva induzida pela formalina. SNAP (1200ug) foi, ou co-administrado com formalina 3% na ATM ipsilateral (ip), ou aplicado na ATM contralateral (ct).

Rato	Formalina 3% +Salina	Formalina 3% +SNAP (ATM ipsilateral)	Formalina 3% +SNAP (ATM contralateral)
1	248.09	24.64	187.07
2	248.07	67.34	225.74
3	267.60	54.60	182.03
4	182.93	85.77	249.09
5	233.90	34.11	238.26
6	198.28		
7	220.45		
8	235.76		
9	211.31		
10	223.87		
Media±epm	227.026±7.977	53.292±11.052 *	216.438±13.556

* (p<0,05; teste Tukey) indica uma diferença significante entre salina e ATM contralateral.

Tabela 5

Valores individuais do aumento da concentração de SNAP na resposta nociceptiva induzida pela formalina 3%.

Rato	Formalina 3% +SNAP 50	Formalina 3% +SNAP 200	Formalina 3% +SNAP 600	Formalina 3% +SNAP 1200
1	93.73	88.20	62.96	24.64
2	159.78	84.32	64.61	67.34
3	166.73	58.99	69.50	54.60
4	161.84	63.14	55.59	85.77
5	130.32	100.86	72.73	34.11
6		86.67	59.96	
Media±epm	142.48±13.76	80.363±6.559 *	64.225±2.547 *	53.292±11.052 *

* ($p<0,05$; teste Tukey) indica uma diferença significativa do SNAP 50ug.

Tabela 6

Valores individuais da aplicação de SIN1 na ATM, na resposta nociceptiva induzida pela formalina. O SIN1 foi, ou co-administrado com formalina 3% na ATM ipsilateral (ip), ou aplicado na ATM contralateral (ct).

Rato	Formalina 3% +Salina	Formalina 3% +SIN 1 (ATM ipsilateral)	Formalina 3% +SIN 1 (ATM contralateral)
1	248.09	43.07	220.67
2	248.07	33.27	198.02
3	267.60	41.13	212.45
4	182.93	40.62	228.18
5	233.90	51.28	238.11
6	198.28		
7	220.45		
8	235.76		
9	211.31		
10	223.87		
Media±epm	227.026±7.977	41.874±2.881 *	219.486±6.834

* ($p<0,05$; teste Tukey) indica uma diferença significativa da salina e ATM contralateral.

TABELA 7

Valores individuais do aumento da concentração do SIN-1 na resposta nociceptiva induzida pela formalina.

Rato	Formalina 3% +SIN 1 (50)	Formalina 3% +SIN 1 (200)	Formalina 3% +SIN 1 (600)	Formalina 3% +SIN 1 (1200)
1	150.62	18.00	56.25	43.07
2	143.05	62.26	52.30	33.27
3	49.56	75.43	29.29	41.13
4	176.64	85.52	51.95	40.62
5	140.77	80.83	44.27	51.28
Media±epm	132.128±21.604	64.408±12.238 *	46.812±4.791 *	41.874±2.881 *

* ($p < 0,05$; teste Tukey) indica uma significativa diferença do 50ug.