

***ELIZABETH TING***

Cirurgiã Dentista

***PARTICIPAÇÃO DA HISTAMINA E DO  
RECEPTOR HISTAMINÉRGICO H<sub>1</sub>  
NA NOCICEPÇÃO EM ATM DE RATOS***

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção de Grau de Mestre em Odontologia, com área de concentração em Fisiologia Oral.

PIRACICABA

2003



***ELIZABETH TING***

Cirurgiã Dentista

***PARTICIPAÇÃO DA HISTAMINA E DO  
RECEPTOR HISTAMINÉRGICO H<sub>1</sub>  
NA NOCICEPÇÃO EM ATM DE RATOS***

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção de Grau de Mestre em Odontologia, com área de concentração em Fisiologia Oral.

**Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Herrera Tambeli**

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

Banca Examinadora: Prof. Dr. Carlos Amílcar Parada

Prof. Dr. Sérgio Roberto P. Line

PIRACICABA

2003

### Ficha Catalográfica

T493p Ting, Elizabeth.  
Participação da histamina e do receptor histaminérgico H<sub>1</sub> na  
nocicepção em ATM de ratos. / Elizabeth Ting. -- Piracicaba,  
SP : [s.n.], 2003.  
xvi, 113p. : il.

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

1. Dor. 2. Articulação temporomandibular. 3. Serotonina. 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.

## **DEDICATÓRIA**

*Dedico este trabalho aos meus pais, meus exemplos de amor e compreensão, e de dedicação ao trabalho; ao meu irmão e ao meu tio, minhas ferramentas para o aprimoramento da paciência, mas também eternos parceiros de risadas e alegrias!*

*Dedico, em especial, este trabalho a minha tia, meu exemplo de pesquisadora e de amor à ciência!*



## **AGRADECIMENTOS**

À **Prof.a Dr.a Cláudia Herrera Tambeli** pela orientação não apenas deste trabalho, como também de ter me colocado na frente das portas de entrada à ciência e mostrado o seu caminho para mim. Além disso, a sua amizade e o seu apoio na maioria dos momentos foram imprescindíveis para o meu crescimento!

À **Prof.a Dr.a Maria Cecília Ferraz de Arruda Veiga** pela co-orientação, colaboração, apoio e ensinamentos dentro e fora da faculdade. Obrigada, minha “mãe” de Piracicaba!

Ao **Prof. Dr. Carlos Amílcar Parada** pela colaboração e disposição para solucionar os “mistérios” dos trabalhos científicos. Além disso, a visão que tem sobre a ciência e o seu conhecimento é realmente admirável!

Ao **Prof. Dr. Sérgio Roberto Peres Line** pelo aceite em participar desta banca, mas agradeço-lhe principalmente por ter estado presente desde o início da minha vida acadêmica motivando e incentivando-me nos estudos.

À **Prof.a Dr.a Fernanda Klein Marcondes** pelos ensinamentos e pelo apoio no departamento de Ciências Fisiológicas.

Aos Professores **Dr. Mauro de Arruda Nóbilo**, **Dr. Eduardo Dias de Andrade** e **Dr.a Silvana Pereira Barros** pelas sugestões, colaboração e avaliação da versão preliminar deste trabalho.

A todos os funcionários do departamento, especialmente ao **Carlos Alberto A. Feliciano**, **Shirley R. S. Moreto**, **Eliete Riguetto**, **Daniele A. Antonio**, **Érica Paula P. Nunes** que estiveram sempre de prontidão para auxiliar.

A todos os meus colegas de curso que de formas variadas me ajudaram no meu crescimento na didática do ensino e amadurecimento sobre a vida. Agradeço especialmente a **Luciane L. F. R. Rodrigues**, **Mariana Trevisani Arthuri**, **Fábio José Bianchi** e **Franco Arsati** pelo apoio e amizade em todos os momentos, mas principalmente nos momentos mais difíceis, e também a **Maria Cláudia de Oliveira** que além de ter sido tudo isso também colaborou para a realização deste trabalho.

Às minhas amigas de graduação, que ficarão para toda a vida, **Thaisângela Rodrigues Lopes e Silva**, **Daniela Beatriz de Toledo**, **Bianca Pianelli Fiori** e, em especial, à **Cristiane Machado** que estiveram sempre por perto, seja na alegria, seja na tristeza durante estes últimos 6 anos.

Aos meus melhores amigos de infância, **Samira Furlan Miguel**, e de adolescência, **Felipe Puggina Rogatto**, que mesmo com o tempo e a distância nos afastando da convivência, estiveram sempre presentes com mesma ou maior intensidade na minha vida.

Aos meus amigos de Ribeirão Preto, **Christiane Becari**, **Daniela de Godoi Gonçalves**, **Denis de Melo Soares** e **Luiz Fernando Ferrari** por terem me dado um novo sentido na palavra amizade; em especial, ao **Heitor Jin Haw Chen**, que além da amizade foi como um irmão para mim enquanto estive em Ribeirão Preto.

A Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP/Unicamp), em especial, ao Departamento de Ciências Fisiológicas por ter me dado a oportunidade e todas as condições necessárias para a realização não apenas deste trabalho como também de outros anteriores.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.





## ***EPÍGRAFE***

*"A coisa mais bela que o homem pode experimentar é o mistério.  
É essa emoção fundamental que está na raiz  
de toda ciência e toda arte."*

*Albert Einstein*

*"A persistência é o caminho do êxito."*

*Charles Chaplin*



## **SUMÁRIO**

LISTA DE FIGURAS	1
LISTA DE GRÁFICOS	2
LISTA DE TABELAS	3
LISTA DE ABREVIATURAS	4
RESUMO	6
ABSTRACT	8
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>10</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>14</b>
<b>2.1. DOR</b>	<b>15</b>
<b>2.2. DOR E DISFUNÇÃO TEMPOROMANDIBULAR</b>	<b>16</b>
<b>2.3. MECANISMOS NEUROBIOLÓGICOS DA DOR OROFACIAL</b>	<b>20</b>
<b>2.4. MEDIADORES QUÍMICOS DA DOR E DA INFLAMAÇÃO</b>	<b>28</b>
<b>2.4.1. HISTAMINA</b>	<b>30</b>
<b>2.4.2. SEROTONINA</b>	<b>35</b>
<b>2.5. TESTE DA FORMALINA</b>	<b>36</b>
<b>2.6. TESTE DA CARRAGENINA</b>	<b>41</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>46</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>48</b>
<b>4.1. ANIMAIS</b>	<b>49</b>
<b>4.2. PROCEDIMENTOS GERAIS</b>	<b>50</b>

---

<b>4.3. INJEÇÕES NA REGIÃO DA ATM</b>	50
<b>4.4. TESTE COMPORTAMENTAL</b>	51
<b>4.5. CONFIRMAÇÃO DO LOCAL DA INJEÇÃO NA ATM</b>	52
<b>4.6. SOLUÇÕES E DOSES EMPREGADAS</b>	54
<b>4.7. GRUPOS EXPERIMENTAIS</b>	55
<b>4.7.1. EFEITO NOCICEPTIVO DA ADMINISTRAÇÃO DE HISTAMINA NA REGIÃO DA ATM DE RATOS</b>	55
<b>4.7.2. EFEITO DA SENSIBILIZAÇÃO DOS NOCICEPTORES DA ATM DE RATOS</b>	56
<b>4.7.3. ADMINISTRAÇÃO DE HISTAMINA NA ATM DE RATOS PREVIAMENTE SENSIBILIZADA PELA CARRAGENINA</b>	57
<b>4.8. ANÁLISE DE DADOS</b>	58
<b>5. RESULTADOS</b>	59
<b>5.1. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE HISTAMINA NA REGIÃO DA ATM DE RATOS</b>	60
<b>5.2. ESTUDO DO EFEITO NOCICEPTIVO DA HISTAMINA NA ATM DE RATOS</b>	63
<b>5.3. PAPEL DA HISTAMINA NA ATM PREVIAMENTE SENSIBILIZADA PELA ADMINISTRAÇÃO DE CARRAGENINA</b>	66
<b>6. DISCUSSÃO</b>	69
<b>7. CONCLUSÕES</b>	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
ANEXO 1	96
ANEXO 2	97
APÊNDICE	98





## ***LISTA DE FIGURAS***

- FIGURA 1 – Modulação localizada da dor de acordo com a teoria da comporta (WALL & MELZACK, 1999). 26
- FIGURA 2 – Núcleo do Trato Espinhal do Nervo Trigêmeo (NTE). 26
- FIGURA 3 – Lesão induzida por corte com bisturi levando à liberação de mediadores e a sensibilização/ativação das fibras aferentes da nocicepção. 33
- FIGURA 4 – Administração da droga na ATM do animal: posição de inserção da agulha hipodérmica calibre 30 que está conectada a uma seringa de microlitro Hamilton por meio de uma cânula de polietileno P50. 59
- FIGURA 5 – Visualização do sítio de injeção da droga: ATM dissecada após o sacrifício, confirmando o local de administração da droga (contraste visual devido ao corante Azul de Evans). 61

## ***LISTA DE GRÁFICOS***

GRÁFICO 1a –	Efeito da administração de histamina na região da ATM de ratos.	71
GRÁFICO 1b –	Efeito da co-administração do antagonista do receptor histaminérgico do tipo H <sub>1</sub> (pirilamina) ou a do derivado quaternário da lidocaína (QX-314), com histamina.	71
GRÁFICO 2a –	Efeito da administração de serotonina na região da ATM induzindo resposta nociceptiva.	74
GRÁFICO 2b –	Efeito da co-administração de uma dose sublimiar (dose insuficiente para produzir resposta nociceptiva) de serotonina (100µg) com uma dose sublimiar de histamina (100µg) na região da ATM de ratos induzindo resposta nociceptiva.	74
GRÁFICO 3a –	Comprovação do efeito de sensibilização da ATM pela administração de carragenina.	77
GRÁFICO 3b –	Efeito da administração de histamina na ATM previamente sensibilizada pela administração de carragenina na região da ATM de ratos.	77

***LISTA DE TABELAS***

TABELA 1a –	Efeito da administração de histamina na região da ATM de ratos.	70
TABELA 1b –	Efeito da co-administração do antagonista do receptor histaminérgico do tipo H <sub>1</sub> (pirilamina) ou a do derivado quaternário da lidocaína (QX-314), com histamina.	70
TABELA 2a –	Efeito da administração de serotonina na região da ATM induzindo resposta nociceptiva	73
TABELA 2b –	Efeito da co-administração de uma dose sublimiar (dose insuficiente para produzir resposta nociceptiva) de serotonina (100µg) com uma dose sublimiar de histamina (100µg) na região da ATM de ratos induzindo resposta nociceptiva.	73
TABELA 3a –	Comprovação do efeito de sensibilização da ATM pela administração de carragenina.	76
TABELA 3b –	Efeito da administração de histamina na ATM previamente sensibilizada pela administração de carragenina na região da ATM de ratos.	76

## ***LISTA DE ABREVIATURAS***

- 5-HT – 5-Hidroxitriptamina
- ADA – Associação Dental Americana
- AINE – Antiinflamatório Não-Esteroidal
- ATM – Articulação Temporomandibular
- BK – Bradicinina
- CG – Carragenina
- CGRP – Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina
- DAG – Diacilglicerol
- DTM – Disfunção Temporomandibular
- E.P.M. – Erro Padrão da Média
- Gi – Proteína G inibitória
- i.a. – intra-articular
- i.d. – intradérmica
- i.p. – intraperitoneal
- IASP – Associação Internacional para o Estudo da Dor
- IL-6 – Interleucina-6
- IP<sub>3</sub> – Inositol 1,4,5-trifosfato
- NGF – Fator de Crescimento Neural
- NMDA – N-metil-D-aspartato

NO- Óxido Nítrico

NTE – Núcleo do Trato Espinal do Nervo Trigêmeo

OM – Óleo de Mostarda

PG – Prostaglandina

QX-314 – Derivado Quaternário da Lidocaína Hidrofílica

RINF – Resposta Inflamatória Não Fagocítica

RIF – Resposta Inflamatória Fagocítica

s.c. – subcutânea

s.p. – subplantar

SNC – Sistema Nervoso Central

SP- Substância P

SST – Sistema Sensitivo Trigeminal

TNF- $\alpha$  – Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$

TNL – Terminação Nervosa Livre



**RESUMO**

Tem sido descrito que a administração sistêmica de antagonista de receptores histaminérgicos do tipo H<sub>1</sub> pode amenizar a dor associada às disfunções temporomandibulares, no entanto, não se sabe se esse efeito é decorrente de uma ação central ou periférica. A literatura mostra-se escassa com relação ao papel da histamina e dos receptores histaminérgicos periféricos na dor proveniente da ATM. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi verificar a participação da histamina e do receptor histaminérgico periférico do tipo H<sub>1</sub> na indução da resposta comportamental nociceptiva na região da ATM de ratos, como também na ATM sensibilizada por serotonina ou carragenina. Para isso, os primeiros grupos experimentais receberam a administração de 50µL de histamina em diferentes concentrações (100µg, n=6; 250µg, n=7; e 500µg, n=10) ou de salina 0,9% (controle, n=14) na região da ATM de ratos. Para o estudo da sensibilização dos nociceptores da ATM a histamina (100µg/25µL) foi co-administrada com a serotonina (100µg/25µL, n=10) e posteriormente a histamina (100µg/25µL) foi administrada 1 hora após à administração de carragenina (100µg/50µL, n=8). As respostas nociceptivas foram quantificadas através da soma (segundos) dos

comportamentos de coçar a região orofacial e de levantar rapidamente a cabeça (ROVERONI *et al.*, 2001) durante um período de 30 minutos. Os dados obtidos, em média  $\pm$  E.P.M, foram submetidos à Análise de Variância e as comparações múltiplas foram realizadas pelo teste de Tukey com nível de significância para  $p \leq 0,05$ . A histamina na dose de 250 $\mu$ g induziu respostas comportamentais nociceptivas significativamente maiores quando comparadas com a administração de salina 0,9%, entretanto quando co-administrada com o anestésico local QX-314 (4%/25 $\mu$ L, n=8) ou com a pirlamina (400 $\mu$ g/25 $\mu$ L, n=10) esse efeito foi bloqueado comprovando o caráter nociceptivo da histamina e o envolvimento do receptor H<sub>1</sub> na ATM de ratos. A co-administração de histamina e serotonina em doses sublimiáres (100 $\mu$ g) desencadeou respostas comportamentais nociceptivas significativas. Entretanto a administração de histamina (100 $\mu$ g/25 $\mu$ L) na ATM de ratos previamente sensibilizada pela carragenina não alterou a nocicepção. Pode-se concluir que a histamina induz respostas nociceptivas na região da ATM de ratos pela ativação de receptores H<sub>1</sub> periféricos, e apresenta um efeito sinérgico com a serotonina, mas não com a carragenina na nocicepção.

***ABSTRACT***

Systemic blockade of histaminergic H<sub>1</sub> receptors seems to be related to pain relief associated to temporomandibular dysfunctions. However, it is unknown whether this effect is due to blockade of receptors located in TMJ region or proceeding from the central nervous system. Few studies related about the effect of histamine and its peripheral histaminergic receptors in pain proceeding from the TMJ region. The aim of this study was to verify the participation of histamine and its peripheral histaminergic H<sub>1</sub> receptors involved in the nociceptive responses from TMJ region of rats, and also when TMJ is sensitized by serotonin or carrageenin. The first experimental groups received the administration of 50µL of histamine in different concentrations (100µg, n=6; 250µg, n=7; 500µg, n=10) or saline 0.9% (control, n=14) in the TMJ region of rats. To verify the participation of the histamine in the sensitization of nociceptors in TMJ it was carried out a group receiving co-administration of histamine (100µg/25µL) and serotonin (100µg/25µL, n=10), and another group receiving administration of histamine (100µg/25µL) 1-hour later administration of carrageenin (100µg/50µL, n=8). The nociceptive responses were quantified by addition (in seconds) of two behaviors: rubbing

the orofacial region and flinching the head quickly (ROVERONI *et al.*, 2001) during the period of 30 minutes. All data were showed in means  $\pm$  S.E.M., and were submitted to statistic analysis (Analysis of Variance – ANOVA ( $p \leq 0.05$ ) and multiple comparisons were performed by TUKEY's test). Nociceptive effect of histamine was verified in the concentration of 250 $\mu$ g, which was significantly higher than the effect promoted by saline 0.9%. However, when histamine (250 $\mu$ g/25 $\mu$ L) was co-administrated with the local anaesthetic QX-314 (4%, 25 $\mu$ L n=8) or with pyrilamine (400 $\mu$ g/25 $\mu$ L, n=10) the nociceptive effect was blocked. The co-administration of histamine and serotonin in sublimiar concentrations (100 $\mu$ g) showed a synergic effect promoting significantly nociceptive responses. The administration of histamine (100 $\mu$ g/25 $\mu$ L) in TMJ sensitized by carrageenin (100 $\mu$ g) previously does not change the nociception. It can be concluded that histamine induced nociceptive responses in TMJ region of rats by direct activation of peripheral histaminergic H<sub>1</sub> receptors, and presents a synergic effect with the serotonin, but not with the carrageenin in the nociception.

# *Introdução*



## 1. INTRODUÇÃO

A dor orofacial destaca-se das demais dores somáticas devido a sua grande intensidade e alta frequência, o que muitas vezes impede um indivíduo de manter as suas atividades normais (SIQUEIRA & TEIXEIRA, 2001). Estudos epidemiológicos mostram que aproximadamente 32% de todos os adultos sofrerão algum tipo de Disfunção Temporomandibular (DTM) durante suas vidas, sendo 70% desses casos acompanhados de dor (ALDER *et al.*, 1992). Apesar da sua alta incidência, as condições dolorosas da articulação temporomandibular (ATM) geralmente são refratárias aos tratamentos existentes, e embora sejam comumente associadas a processos inflamatórios, há poucos estudos sobre os mecanismos neuroquímicos periféricos envolvidos nessas condições.

Dentre as várias substâncias liberadas após lesão tecidual está a histamina. A histamina é encontrada principalmente nos grânulos dos mastócitos (RILEY *et al.*, 1953) e tem sido implicada na resposta dolorosa através da ativação de receptores histaminérgicos do tipo H<sub>1</sub> periféricos e centrais. A antinocicepção induzida em camundongos mutantes desprovidos de receptores histaminérgicos do tipo H<sub>1</sub> é um exemplo disso

(MOBARAKEH *et al.*, 2000). Periféricamente, tem sido demonstrado que a administração intracutânea de histamina na pata de ratos provoca respostas nociceptivas mediadas pela ativação do receptor histaminérgico local do tipo H<sub>1</sub> (CARSTENS *et al.*, 1997). Ainda nesse contexto, a resposta nociceptiva induzida pela administração de formalina na pata de ratos é mediada pela liberação de histamina endógena e conseqüente ativação do receptor histaminérgico do tipo H<sub>1</sub> (PARADA *et al.*, 2001).

A evidência de que o RNAm dos receptores histaminérgicos do tipo H<sub>1</sub> é expresso nos gânglios trigeminais (NAKASAKI *et al.*, 1999) coloca a histamina e os receptores histaminérgicos do tipo H<sub>1</sub> entre os possíveis fatores envolvidos nas condições dolorosas da ATM. Essa idéia vem se consolidando após uma série de evidências científicas. Dentre elas está o fato da administração de histamina na ATM de gatos ativar neurônios nociceptivos específicos e convergentes do subnúcleo caudal (BROTTON *et al.*, 1988) e desencadear respostas reflexas nos músculos da mastigação (BROTTON & SESSLE, 1988). Também tem sido proposto, que o aumento da atividade muscular durante as disfunções da ATM aumenta a síntese de histamina podendo resultar em dor e inflamação na região da ATM (WATANABE *et al.*, 1999). Segundo esses mesmos autores, o anti-histamínico seletivo para o

receptor histaminérgico  $H_1$  neorestamin é tão eficaz quanto o analgésico antiinflamatório não esteroideal flurbiprofeno no alívio da dor associada às disfunções da ATM, é mais eficaz ainda no alívio dos sintomas associados a essas disfunções, como dor de cabeça por exemplo, e possui menos efeitos colaterais. No entanto, além do anti-histamínico seletivo para o receptor histaminérgico  $H_1$  produzir efeitos hipnóticos como indução do sono fisiológico, não se sabe se o efeito analgésico é desencadeado pela ação do mesmo em receptores  $H_1$  localizados na região da ATM ou no sistema nervoso central. Nesse contexto, o estudo do papel da histamina e dos receptores histaminérgicos do tipo  $H_1$  periféricos na dor proveniente da ATM é de grande relevância científica e terapêutica. E o modelo comportamental de nocicepção na ATM de ratos (ROVERONI *et al.*, 2001), foi utilizado como modelo de dor da ATM no presente estudo.



# *Revisão da Literatura*



## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1. DOR**

A dor é definida pela Associação Internacional para Estudo da Dor (IASP) como sendo uma “experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano tecidual real ou potencial ou descrita tal como se o dano estivesse presente”. Ela é uma sensação descrita como sendo uma experiência multidimensional a qual estão envolvidos vários componentes: motivacional, aspecto emocional, sensório-discriminativo, aspectos afetivos e aspectos cognitivos (MERSKY, 1986).

Além disso, a dor é um mecanismo de demarcação de limites para o organismo e de aviso quanto à ocorrência de estímulos que possam ser lesivos provenientes do meio externo ou dele próprio (LENT, 2001). Uma grande parte dos episódios dolorosos são desencadeados por lesão tecidual e a reação natural do organismo ao trauma é protegê-lo impedindo que uma destruição tecidual ainda maior ocorra, através da inflamação, e ao mesmo tempo alertando o cérebro do perigo eminente através da sensação dolorosa (COOPER, 1990).

No entanto, embora a dor seja essencial para a preservação da vida, em muitas circunstâncias, ela perde o seu caráter protetor e passa a constituir a própria doença (CODERRE *et al.*, 1993).

Alterações no local da lesão envolvem receptores especializados chamados *nociceptores* que sinalizam um dano tecidual. Frequentemente, a dor ocorre através da ativação desses nociceptores específicos a partir dos locais de lesão do tecido ou nervo (MILLAN, 1999), e muitas vezes induz estímulos por períodos prolongados no Sistema Nervoso Central (SNC) que contribuem para a dor persistente.

## **2.2. DOR E DISFUNÇÃO TEMPOROMANDIBULAR**

O estudo das dores músculo-esqueléticas faciais recebeu enorme impulso por volta da década de 1930. COSTEN (1934) relatou casos de pacientes com otalgia que ele atribuía como resultado da compressão do nervo auriculotemporal pelo côndilo mandibular, em decorrência da perda de dentes posteriores. Entretanto, como não havia nenhuma comprovação científica quanto a essa correlação, a síndrome tornou-se motivo de grande interesse científico. Estudos posteriores com grupos de pacientes apresentando

sintomatologia de dor periauricular levaram à descrição da Síndrome da Dor e Disfunção da Articulação Temporomandibular (SCHWARTZ & CHAYES, 1973). No Brasil, o termo “Disfunção de ATM” é utilizado genericamente para designar as condições dolorosas músculo-esquelética orofacial (SIQUEIRA & TEIXEIRA, 2001).

Atualmente, as DTMs têm sido identificadas como a maior causa de dor de origem não dentária na região orofacial e são consideradas como sendo uma subclassificação de desordens músculos-esqueléticas (BELL, 1989).

O avanço na qualidade de investigação clínica e a pesquisa nas áreas básicas (THILANDER, 1961) proporcionaram, na década de 1970, as técnicas de diagnóstico por imagens, permitindo a visualização das estruturas intracapsulares (McNEILL, 1993). Dentre essas técnicas, especialmente a de imagem por ressonância magnética e a artroscopia, associadas a uma maior experiência no tratamento clínico, puderam fornecer informações para um diagnóstico articular mais específico (DWORKIN *et al.*, 1990).

Tornou-se claro, então, que o diagnóstico correto é de suma importância para o tratamento das DTMs, o que levou ao desenvolvimento de métodos de diagnósticos e terapêuticos para essas patologias. A Associação

Dental Americana (ADA) realizou uma conferência em 1982 sobre exame, diagnóstico e tratamento das DTMs (GRIFFITHS, 1983), quando foi reconhecida que as dores orofaciais crônicas e o uso de programas multi e interdisciplinares tinham de se tornar comuns.

Contudo, freqüentemente a etiologia das DTMs é multifatorial e difícil de ser claramente determinada. CLARK *et al.* (1987) postularam que as cinco maiores causas que podem ser consideradas como as mais prováveis etiologias das DTMs são: macrotrauma, microtrauma, artrites, carga biomecânica anormal e tensão muscular.

Segundo esses mesmos autores, o macrotrauma refere-se ao impacto ao aparelho temporomandibular ou um sobre-estiramento do mesmo. Já o microtrauma pode ser devido a um comportamento repetitivo, como a abrasão, apertamento ou mastigação atípica. Tais comportamentos podem ser altamente prejudiciais e desencadearem dores articulares e desordens nos músculos mastigatórios.

A artrite em suas formas degenerativa e inflamatória é um outro fator etiológico que se manifesta em muitos pacientes com DTMs. Um pequeno estímulo mecânico, como a de uma leve compressão na região da

ATM pode produzir sensação dolorosa na própria ATM, bem como nos músculos mastigatórios (CHENITZ, 1992).

As cargas biomecânicas anormais na ATM também são consideradas fatores etiológicos das DTMs que podem ocorrer quando as estruturas dentais nas suas faces oclusais se desenvolvem insatisfatoriamente (hipoplasias) ou sofrem deteriorações como resultados da perda dental ou da estrutura dental (HANSON, 1979).

Finalmente, segundo a classificação das etiologias das DTMs por CLARK (1987) está a tensão muscular induzida pelo estresse e que envolvem as disfunções dos músculos mastigatórios.

Os estudos epidemiológicos também têm contribuído para a elaboração de programas de cuidados destinados à profilaxia e ao tratamento dos doentes que dela padecem, através da análise da distribuição e dos determinantes de sua ocorrência em populações ou grupos (SIQUEIRA & TEIXEIRA, 2001).

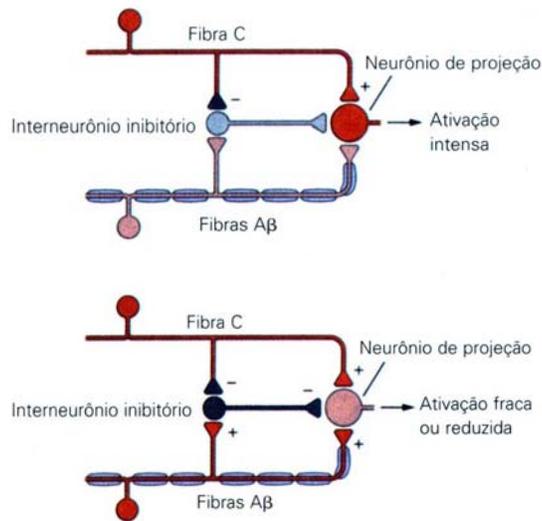
### 2.3. MECANISMOS NEUROBIOLÓGICOS DA DOR OROFACIAL

De uma forma geral, os tecidos orofaciais são inervados pelo nervo trigêmeo (V par) que é responsável pela captação e transmissão de informações dolorosas provenientes desta mesma região. As estruturas que o compõe são: receptores sensoriais, fibras nervosas e os neurônios de primeira ordem, cujos corpos celulares estão localizados no gânglio trigeminal (MACHADO, 1993).

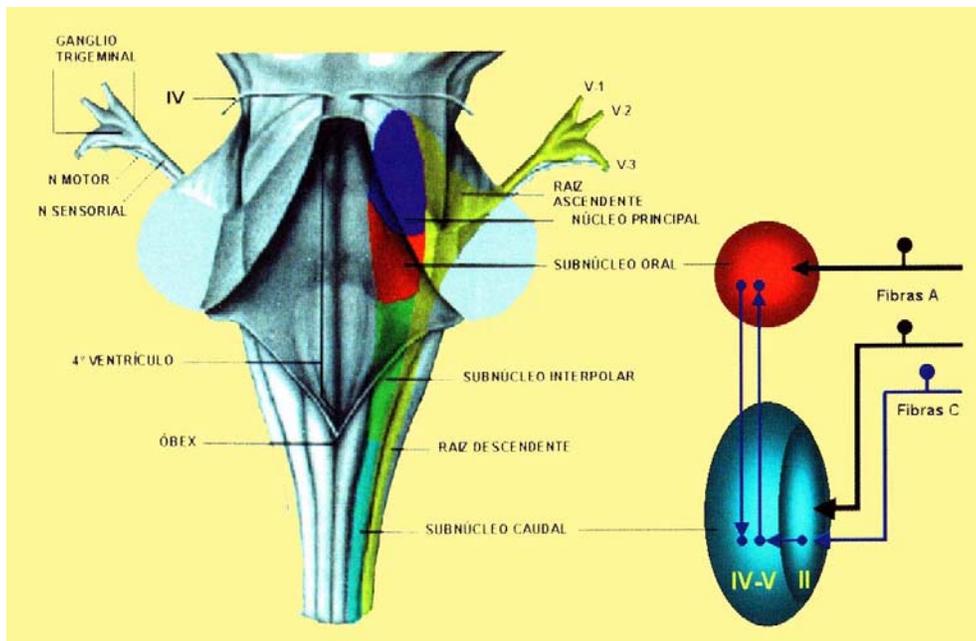
Os receptores sensoriais capazes de captar estímulos nocivos de diversas naturezas (mecânicos, químicos, térmicos ou elétricos) são denominados de *nociceptores*. Eles estão presentes em vários tecidos orofaciais: pele, tecido subcutâneo, tecido adiposo, camada adventícia dos vasos sangüíneos, mucosa oral, polpa dental, periósteo, fáscia, músculos, cápsula e ligamentos da ATM. Esse sistema de receptores nociceptivos é representado por um arranjo plexiforme e de terminações nervosas livres (TNL) de fibras nervosas amielínicas (SESSLE, 1995). Em circunstâncias normais, este sistema está inativo, mas não completamente, ou seja, mantém-se no estado basal. Quando os nociceptores são excitados, enviam informações ao SNC, através das fibras aferentes, para que ele identifique a intensidade,

qualidade, localização e duração desse estímulo. A intensidade e duração do estímulo nociceptivo são determinados pela frequência e tempo de excitação da fibra aferente nociceptiva. A qualidade do estímulo está relacionada com o padrão de resposta da fibra aferente a um estímulo nocivo particular. Já a localização do estímulo depende do campo receptivo da fibra (SESSLE, 2000).

As fibras aferentes que conduzem a informação nociceptiva são: as fibras do tipo C (polimodais, de pequeno calibre, amielínicas, de velocidade de condução de 0,5 a 2,0m/s) e fibras do tipo A $\delta$  (mielínicas, com velocidade de condução de 5 a 30m/s) (AGHABEIGI, 1992). Existem ainda as fibras do tipo A $\beta$  que são fibras mielinizadas, mecanorreceptivas e que conduzem as informações táteis com velocidade de condução de 30 a 70m/s, mas que estão envolvidas no processo de modulação do estímulo doloroso (DUBNER & BENNETT, 1983), e conforme a teoria da comporta proposta por WALL & MELZACK (1999), ilustrada na FIG. 1.



**FIGURA 1** - Modulação localizada da dor de acordo com a teoria da comporta (WALL & MELZACK, 1999). Reproduzida de KANDEL *et al.*, 2003.



**FIGURA 2** – Núcleo do Trato Espinal do Nervo Trigêmeo (NTE). Reproduzida de SIQUEIRA & TEIXEIRA, 2001.

As fibras do tipo A $\delta$  e do tipo C entram no SNC pela ponte fazendo sinapse com os neurônios localizados no núcleo do trato espinhal do nervo trigêmeo (NTE), que é subdividido em subnúcleo oral, subnúcleo interpolar e subnúcleo caudal (SESSLE, 1996) (FIG. 2).

As fibras nervosas de pequeno diâmetro (C e A $\delta$ ), nociceptivas, terminam nas lâminas I, II, V e VI do subnúcleo caudal. Enquanto que a fibra A $\beta$  tem sua projeção para as lâminas III a VI, como também para o subnúcleo oral (SESSLE, 1995).

O subnúcleo caudal possui além de neurônios nociceptivos específicos que respondem somente a estímulos nocivos, também os convergentes ou multirreceptivos que respondem tanto a estímulos mecânicos (não-nocivos) como a estímulos nocivos (YU *et al.*, 1993).

Os neurônios nociceptivos do subnúcleo caudal parecem apresentar uma extensa convergência de fibras nervosas aferentes, sendo elas provenientes da pele e da mucosa (tecidos superficiais), e da ATM, músculos mastigatórios, língua e da dura-máter (tecidos profundos). Essa convergência de fibras da ATM e músculos mastigatórios para os neurônios nociceptivos superficiais, pelo menos em parte, pode explicar a dificuldade na localização

exata de estímulos nocivos profundos e a dor referida que freqüentemente está associada a esses tecidos (HU *et al.*, 1994).

A confirmação de que o subnúcleo caudal é a principal região receptora e transmissora de informações nociceptivas do sistema sensitivo trigeminal (SST) pode ser feita a partir da apresentação de dados clínicos apresentados por SESSLE (2000) e também, laboratoriais (HU *et al.*, 1994; TSAI *et al.*, 1999).

Além de apresentar um papel crucial na transmissão nociceptiva dos tecidos orofaciais profundos, o subnúcleo caudal também está criticamente envolvido na expressão de respostas reflexas nociceptivas. Estudos eletromiográficos mostraram um aumento na atividade dos músculos envolvidos na abertura e fechamento bucal induzido por estímulos dolorosos na região da ATM. Sugere-se que essas informações nociceptivas possam ter ativado os neurônios do subnúcleo caudal através de conexões com os centros reflexos do tronco cerebral, desencadeando desta forma, a ativação tanto dos músculos agonistas como os antagonistas, limitando os movimentos mandibulares em condições fisiopatológicas (SESSLE, 1995; HU *et al.*, 1997).

Além do subnúcleo caudal, o subnúcleo interpolar e oral também estão relacionados à expressão da informação nociceptiva, através de ligações de interneurônios entre os subnúcleos, que são capazes de modular a resposta entre os subnúcleos.

HATHAWAY *et al.* (1995), utilizaram a expressão da proteína Fos (proteína indicadora da atividade neuronal), após a estimulação química nociva na ATM de ratos, com a finalidade de quantificar o número e a distribuição de grupos de neurônios em diferentes regiões do NTE, e foi verificado maior concentração na região inferior do subnúcleo interpolar e no subnúcleo caudal, bem como no corno dorsal da medula espinhal cervical superior.

O subnúcleo oral também apresenta um elemento importante no processamento da dor orofacial, parece estar especialmente envolvido nos mecanismos nociceptivos intra e periorais (SESSLE, 1995). Mesmo apesar de ser desprovido de substância gelatinosa, o subnúcleo oral contém neurônios que exibem o fenômeno “Wind-up” (PARADA *et al.*, 1997), semelhante àquele que ocorre no corno dorsal da medula espinhal. “Wind-up” é uma expressão designada a um aumento progressivo no potencial de ação da

descarga nos neurônios do corno posterior (aumento da excitabilidade de neurônios da medula), como consequência da estimulação repetitiva de fibras C aferentes. O fenômeno não se refere a uma sensibilização central, no entanto, ele pode servir de iniciador no processo de sensibilização (WOOLF, 1996).

Após o processamento das informações dolorosas no NTE, elas são retransmitidas para as diversas áreas do SNC, como formação reticular, núcleo do trato solitário, tálamo, córtex cerebral, córtex cerebelar, hipotálamo, substância cinzenta periaquedutal, etc (SESSLE, 1996).

Segundo SESSLE (2000), as sinapses com a formação reticular e as estruturas adjacentes no tronco cerebral são determinantes para o desencadeamento de respostas autonômicas reflexas perante estímulos nocivos, tais como alterações na frequência respiratória e cardíaca, e alterações na pressão arterial. AGHABEIGI (1992) sugere que a projeção espinotalâmica ao tálamo medial e deste para o córtex frontal estão relacionados com o componente afetivo e motivacional da dor. Enquanto que a projeção para o tálamo ventrobasal e deste para o córtex somatossensorial são responsáveis pelo componente sensório-discriminativo da dor.

Apesar da existência de um grande número de intercomunicações entre todo o complexo trigeminal e áreas adjacentes no tronco cerebral, a principal área de projeção é o tálamo contralateral. A região talâmica ventrobasal é a responsável por receber e transmitir informações somatossensoriais provenientes dos tecidos orofaciais (SESSLE, 1996). Essa região contém neurônios nociceptivos específicos e convergentes, funcionalmente similares aos daqueles existentes no subnúcleo caudal, que ao se projetarem para áreas específicas do córtex cerebral determinam o caráter multidimensional da experiência dolorosa (SESSLE, 2000; LUND *et al.*, 2001).

A sensação dolorosa origina-se desde a captação do estímulo nocivo até a sua interpretação. O processo depende da interação do complexo neuroanatômico periférico e central, ao qual envolvem um conjunto de substâncias neuroquímicas essenciais para que todo esse mecanismo seja funcional. Ao ocorrer uma lesão tecidual, imediatamente uma série de respostas é desencadeada pelo organismo por intermédio da liberação de substância, tais como: ácido láctico, bradicinina (BK), prostaglandinas (PG), substância P (SP), íons potássio, serotonina, histamina, fator de crescimento neural (NGF), peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), íons

hidrogênio, ATP, citocinas, óxido nítrico (NO) e outras, levando a alterações neuroplásticas periféricas e centrais (DRAY, 1995; SWIFT *et al.*, 1998).

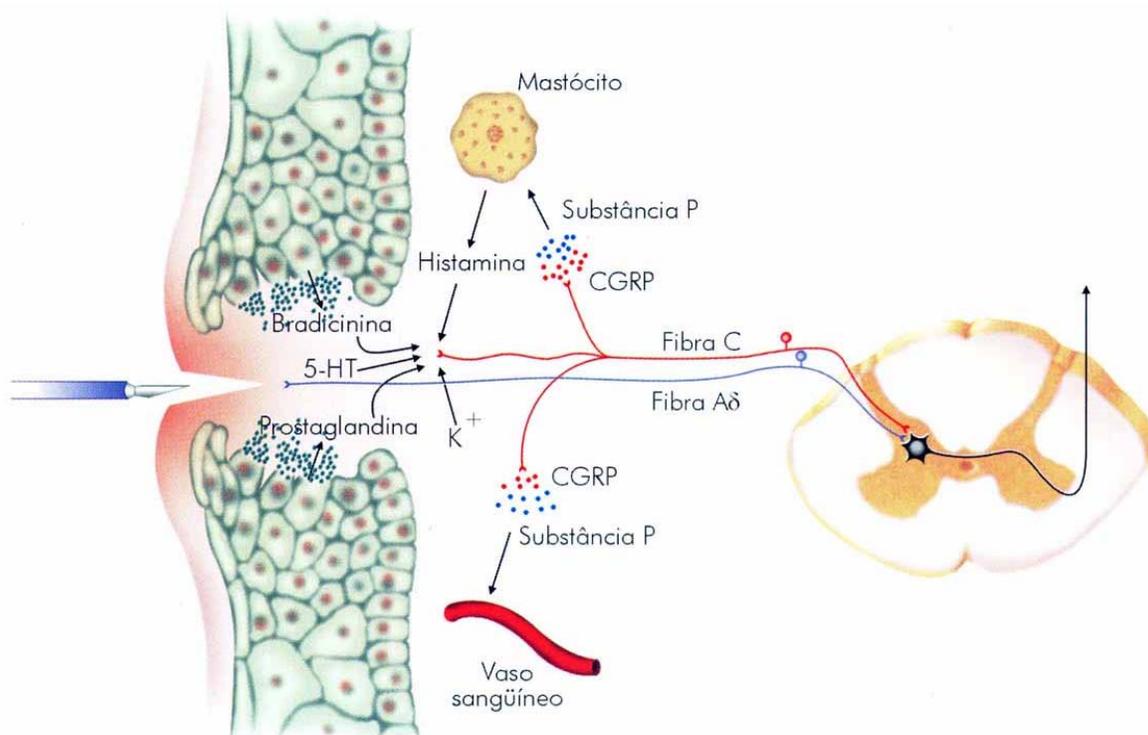
## **2.4. MEDIADORES QUÍMICOS DA DOR E DA INFLAMAÇÃO**

O processamento da informação nociceptiva, como visto anteriormente, depende de uma série de mudanças no local do trauma ou lesão tecidual. Uma grande quantidade de mediadores químicos é liberada na área da lesão. Dentre eles, estão a bradicinina (liberada pela lesão vascular com efeito pró-inflamatório, sendo uma das substâncias endógenas mais potentes indutoras de dor), os íons potássio (das células rompidas), prostaglandinas (produto do ácido aracdônico), Substância P (dos terminais axônicos), serotonina (das plaquetas) e histamina (liberada da desgranulação de mastócitos) (WALL & MELZAK, 1999; KANDEL, 2003).

As fibras de pequeno diâmetro são ativadas na presença desses mediadores ocorrendo a sensibilização periférica e condução da nocicepção. As prostaglandinas e as aminas simpatomiméticas são capazes de sensibilizar as fibras nociceptivas, facilitando a dor induzida por estímulos químicos ou

físicos em um fenômeno chamado de alodinia e que envolve a “*up-regulation*” funcional dos nociceptores (FERREIRA *et al.*, 1999).

Esses mediadores promovem uma série de alterações como o aumento da permeabilidade capilar e o extravasamento plasmático, além disso, excitam e sensibilizam os nociceptores aferentes primários, promovendo a irradiação da dor e a subsequente inflamação do tecido subjacente (LENT, 2001; FIG. 3).



**FIGURA 3** – Lesão induzida por corte com bisturi levando à liberação de mediadores e a sensibilização/ativação das fibras aferentes da nociceção. Reproduzida de LENT, 2001.

A sinalização nociceptiva iniciada no local da lesão tecidual conduz as informações até o SNC ao qual ocorrem mudanças que podem contribuir para a amplificação e a persistência da dor. Essas mudanças são referidas como a sensibilização central e que envolvem um aumento na excitabilidade dos neurônios do corno dorsal da medula espinhal através de uma cascata de eventos, incluindo a remoção do bloqueio magnésio voltagem-dependente dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), mudanças na excitabilidade celular, influxo de íons cálcio para o meio intracelular levando a despolarização neuronal e a uma pontencialização na transmissão sináptica. Além disso, ocorre também a ativação de outros receptores envolvendo aminoácidos excitatórios ionotrópicos e metabotrópicos, neuropeptídeos como SP, neurotrofinas e cinases envolvidos no processo de fosforilação (REN & DUBNER, 1999).

#### **2.4.1. HISTAMINA**

##### ***Efeito Nociceptivo***

A histamina é uma das substâncias liberadas na desgranulação de mastócitos durante um processo inflamatório. Desde 1939 ROSENTHAL &

MINARD já haviam sugerido que a histamina exercia um papel de mediador na dor cutânea, tanto em dados clínicos como em animais (ROSENTHAL, 1977; NINKOVIC *et al.*, 1982), bem como a administração subcutânea de um anti-histamínico conseguia abolir as respostas dolorosas provocadas por beliscão, picadas ou corte em animais experimentais (ROSENTHAL & MINARD, 1939). Mas foi em 1946, é que DEWS & GRAHAM conduziram o primeiro estudo do efeito antinociceptivo dos anti-histamínicos relatando que a pirilamina (antagonista do receptor H<sub>1</sub>) tinha um efeito analgésico 8 vezes maior do que o de narcóticos em ratos. Desde então, estudos subsequentes avançaram no intuito de desvendar os mecanismos pelos quais a histamina age na nocicepção.

A histamina consegue estimular os nociceptores e receptores histaminérgicos localizados nos neurônios aferentes primários (FOREMAN & JORDAN, 1983). A hidroxizina é um exemplo de antagonista do receptor histaminérgico do tipo H<sub>1</sub> que tem efeito periférico atuando como um anti-histamínico para tratamento de disfunções cutâneas e efeito central usada como uma pré-medicação sedativa, além disso, foi mostrado o seu efeito analgésico ser comparável à da morfina (BERTHOLD & DIONNE, 1993).

Sabe-se que a histamina pode induzir uma hiperalgesia no local em que ela foi liberada (COELHO *et al.*, 1998). Existem várias discussões quanto aos efeitos da histamina induzindo a sensação de coceira e a sensação dolorosa. SIMONE *et al.* (1991) e KODA *et al.* (1996) sugeriram que dependendo da concentração ela é capaz de induzir sensação de coceira ou sensação dolorosa através da ativação de fibras aferentes de pequeno calibre (fibras A $\delta$  e principalmente fibras C), por mecanismos que ainda são pouco conhecidos. Já autores como BARON *et al.* (2001), propuseram que a dor e a coceira são ativadas por fibras C específicas e distintas mas capazes de uma interferir na outra (a ativação da fibra C para dor conseguiria inibir a ativação da fibra C para a coceira).

Os experimentos farmacológicos têm demonstrado que a sensibilização das fibras aferentes é mediada por receptores do tipo H<sub>1</sub> mas não por tipo H<sub>2</sub> ou H<sub>3</sub> (TANI *et al.*, 1990; HUTCHEON *et al.*, 1993; KODA *et al.*, 1996), além disso, a expressão do receptor H<sub>1</sub> tem sido detectada nas fibras de pequeno calibre da raiz dorsal ganglionar pela técnica da autoradiografia (NINKOVIC & HUNT, 1985) e da técnica de hibridização *in situ* (SENBA & KASHIBA, 1996). Sabe-se também que os receptores do tipo H<sub>1</sub> estão frequentemente associados a produção de diacilglicerol (DAG) e inositol

1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>), entretanto, ainda não foi demonstrado que a histamina está envolvida na indução desses mediadores.

A histamina por si só é capaz de despolarizar alguns neurônios do trigêmeo e de nódulos ganglionares, mas normalmente eles não ativam potenciais de ação (HUTCHEON *et al.*, 1993). As despolarizações estão associadas a alterações variáveis na condutância da membrana (aumento ou diminuição) sugerindo diferentes efeitos sobre os canais iônicos. Os efeitos de sensibilização da histamina são mediados pelo mesmo subtipo de receptor (H<sub>1</sub>) e que provavelmente envolvem ação de prostanóides.

GALEOTTI *et al.* (2002) verificaram que os anti-histamínicos (difenidramina, pirilamina e prometazina) atuam sobre os receptores histaminérgicos do tipo H<sub>1</sub> inibindo o efeito despolarizante através da ativação de proteínas G do tipo inibitórias (Gi), subtipos  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  e  $\alpha_3$ . Assim, desvendando, pelo menos em parte, um dos possíveis mecanismos de ação pela qual ocorre a nocicepção ou a antinocicepção via receptor H<sub>1</sub>.

### ***Envolvimento nas Disfunções Articulares***

Nas disfunções articulares como artrite reumatóide, osteoartrite, situações inflamatórias crônicas de articulação, são comumente verificadas no líquido sinovial presença de proliferação de fibroblastos e infiltrado inflamatório com uma rica coleção celular, inclusive de mastócitos e células mononucleares (BROMLEY & WOOLLEY, 1984; HENDERSON & PETTIPHER, 1985). Estudos têm mostrado que existe um aumento significativo no número de mastócitos e da concentração de histamina no líquido sinovial em pacientes com artrite reumatóide (CRISP *et al.*, 1984; FREWIN *et al.*, 1986; MALONE *et al.*, 1986).

Além disso, é verificada também a presença de histamina em músculos da mastigação que após um intenso exercício físico o paciente relata dor. A hipótese é de que durante o exercício intenso ocorre uma lesão do músculo havendo a liberação de histamina pelos mastócitos, e então, induzindo a uma sensação dolorosa e a vasodilatação nos músculos (MORGANROTH *et al.*, 1977).

WATANABE *et al.* (1999) verificaram que a presença de histamina nos músculos da ATM estaria possivelmente, mediando via Interleucina-1, a

ativação da sensação dolorosa nas desordens temporomandibulares. Assim como a presença da histamina no líquido sinovial poderia mediar via interleucina-6 a ativação da sensação dolorosa na artrite reumatóide (TANAKA *et al.*, 1997).

#### **2.4.2. SEROTONINA**

Assim como a histamina, a serotonina ou 5-hidroxitriptamina (5-HT) também é um produto liberado na desgranulação do mastócito. Sabe-se que a serotonina consegue ativar as fibras aferentes primárias via receptor 5-HT<sub>3</sub>, mas também através de outros subtipos de receptores presentes na periferia como a 5-HT<sub>1A</sub> (TAIWO *et al.*, 1992) com possível atuação em conjunto do receptor 5-HT<sub>1C</sub> (BERVOETS *et al.*, 1990), e também do receptor 5-HT<sub>7</sub> (EGLIN, *et al.*, 1997) levando a uma hiperalgesia mecânica.

TAIWO & LEVINE (1992) mostraram que a ação direta da 5-HT sobre a fibra aferente primária, *in vivo*, promovia uma hiperalgesia de curta latência, independente da atuação de neurônios pós-ganglionares simpáticos, como também de neutrófilos e da síntese de prostaglandinas. A capacidade da 5-HT sensibilizar diretamente os neurônios aferentes primários tem sido

verificada através de estudos eletrofisiológicos pela técnica de *patch clamp* (CARDENAS *et al.*, 1997).

SAWYNOK *et al.* (1997) estudaram o envolvimento da 5-HT e seus receptores na nocicepção e na formação do edema no teste da formalina na pata de ratos. Os autores verificaram que ambos efeitos estão relacionados à ativação de receptores purinérgicos P1 ( $A_3$ ) em conjunto com receptores histaminérgicos do tipo  $H_1$  e receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>2</sub>.

Posteriormente, PARADA *et al.* (2001) demonstraram que no teste da formalina existe uma peculiaridade interessante na atuação dos receptores serotoninérgicos, enquanto que o receptor 5-HT<sub>1A</sub> está presente nas duas fases do teste exercendo um papel de ativação de nociceptores periféricos, o receptor 5-HT<sub>3/4</sub> estaria presente principalmente na fase 1.

## **2.5. TESTE DA FORMALINA NA ATM**

O teste da formalina tem sido amplamente utilizado e vem sendo adaptado para se estudar as vias nociceptivas em diferentes regiões do corpo de ratos e camundongos. O teste é considerado um modelo de dor inflamatória

tônica e sensível a várias classes de drogas analgésicas (HUNSKAAR & HOLE, 1987; TJOLSEN *et al.*, 1992).

DUBUISSON & DENNIS (1977), descreveram pela primeira vez o modelo comportamental, partindo da resposta ao estímulo nocivo induzido pela administração cutânea de formaldeído a 37% diluído em solução salina (formalina) no dorso da pata traseira de ratos. Os comportamentos nociceptivos estereotipados, caracterizados pelos atos de lambar e levantar rapidamente a pata eram observados.

Verificou-se que esses comportamentos apresentavam-se um padrão bifásico (WHEELER-ACETO *et al.*, 1990; ROSLAND *et al.*, 1990), uma fase inicial de dor intensa e de curta duração (primeiros 5 minutos) e uma segunda fase de dor moderada e persistente (entre 10 a 60 minutos após a injeção). E um curto período de latência, entre a primeira e a segunda fase, denominado de interfase (HENRY, *et al.*, 1999). Período este, de baixa atividade comportamental que é atribuído à redução momentânea da atividade das fibras nervosas aferentes (PUIG & SORKIN, 1996; McCALL, *et al.*, 1996) e da ação de mecanismos inibitórios descendentes (FRANKLIN & ABBOTT, 1993).

HUNSKAAR & HOLE (1987) sugeriram que a primeira fase é decorrente da estimulação direta de nociceptores e que a segunda fase poderia ser provocada por impulsos aferentes induzidos pela inflamação local.

Entretanto, a comprovação experimental de que na primeira fase há participação de mediadores endógenos, como a bradicinina, histamina, serotonina e substância P, levantaram dúvidas quanto a essa idéia (SHIBATA *et al.*, 1989; PARADA *et al.*, 2001). Assim como tem sido proposto também que a segunda fase está relacionada com o desenvolvimento do processo inflamatório e ser dependente de modificações no sistema nervoso central, induzidas pela atividade neural ocorrida durante a primeira fase (CODERRE *et al.*, 1990; TJOLSEN *et al.*, 1992), como resultado do processo de sensibilização central.

Contudo, a sensibilização central desencadeada pelos impulsos da primeira fase da formalina, pode não ser suficiente para manter as respostas comportamentais nociceptivas na segunda fase. A administração local de um derivado quaternário da lidocaína hidrofílica (QX-314) 10 minutos após a administração de formalina na pata é capaz de inibir as respostas da segunda

fase, sugerindo portanto, a participação do componente periférico (TAYLOR *et al.*, 1995).

PARADA *et al.* (2001) verificaram a importância do componente periférico na segunda fase do teste. O trabalho sugere o envolvimento da histamina e serotonina na segunda fase de respostas induzidas pela administração de formalina na pata traseira de ratos.

CLAVELOU *et al.* (1989) propuseram uma modificação no teste da formalina para que fosse possível este estudo na região orofacial. Os autores observaram que a injeção de formalina no lábio superior de ratos foi capaz de induzir comportamento nociceptivo caracterizado pelo ato de coçar a região orofacial com as patas dianteiras (ambas as patas) e algumas vezes com a pata traseira ipsilateral. Como o modelo original, também foi observado o mesmo padrão bifásico, fase inicial (3 primeiros minutos) e fase tardia (entre 18 a 42 minutos após a injeção).

ROVERONI *et al.* (2001) propuseram o teste da formalina na ATM, desenvolveram um modelo comportamental através da administração de formalina na região da ATM de ratos. A administração de formalina na ATM de ratos desencadeia os comportamentos nociceptivos de coçar a região

orofacial, de levantar rapidamente a cabeça e o de tombar a cabeça para o lado tratado. Esses comportamentos foram reduzidos de forma significativa pela administração de morfina (4mg/Kg, i.p.) 30 minutos antes da injeção da formalina, e também pela co-administração de lidocaína (QX-314, 2%) com a formalina.

Neste modelo, diferentes concentrações de formalina foram testadas (0,5%, 1,5%, 2,5% e 5,0%) e os resultados mostraram que as respostas comportamentais foram significativamente maiores a partir de 1,5% e que acima disso, as respostas não diferiram entre si.

Assim, 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, sejam avaliadas separadamente ou em conjunto, pela soma das mesmas (ROVERONI *et al.*, 2001). Assim como descrito na literatura, a simples soma de mais de um comportamento seria a forma mais adequada de avaliar as respostas comportamentais induzidas pela administração de formalina, uma vez que

pode haver uma integração entre os comportamentos (WHEELER-ACETO & COWAN, 1993; ABBOTT *et al.*, 1995).

Apesar dos testes da formalina na pata e no lábio apresentem um padrão bifásico, o teste da formalina na ATM apresenta uma única fase de resposta, devido à necessidade, mesmo que momentaneamente, de anestésiar o animal com o halotano para a injeção. O fato de anestésiar o animal justifica-se devido à dificuldade de acesso ao local (ATM), além disso, eticamente é um procedimento mais aceitável.

## **2.6. TESTE DA CARRAGENINA**

A carragenina (CG) é o nome atribuído a uma família de polissacarídeos obtidos de algas marinhas vermelhas, denominadas *Chondrus*. Estas algas têm a capacidade de formar uma variedade quase infinita de géis à temperatura ambiente. As principais formas de CG são: kappa ( $\kappa$ ), iota ( $\iota$ ) e lâmbda ( $\lambda$ ), que diferem entre si em termos de suas propriedades e reatividade protéicas.

O teste da carragenina para induzir artrite foi desenvolvido por GARDNER (1960). As injeções intra-articulares (i.a.) de CG foram realizadas em cobaias e coelhos; nos primeiros, também foi empregada a injeção intradérmica (i.d.). Diferentes concentrações de CG (0,25, 0,5, 1,0 e 2,5%) i.d. foram utilizadas e após a análise histológica, verificou-se que a concentração de 1,0% foi a que induziu uma inflamação significativa comparada a concentrações inferiores. Da mesma forma, essa concentração também foi a significativa para indução da artrite. Além disso, cortes histológicos das articulações mostraram características inflamatórias semelhantes aos dos pacientes que apresentavam artrite reumatóide, verificados após a sua morte. Sabe-se que a CG não é conhecida como antigênica, não induz efeitos sistêmicos e tem um alto grau de reprodutividade, além disso, é de fácil manuseio, menos susceptível a alterações ambientais quando comparada a outros mucopolissacarídeos sendo, portanto, uma substância adequada para o estudo do processo inflamatório.

Em 1974, BOLAM *et al.* estudaram a atividade inflamatória de uma fração do plasma humano no edema induzido por CG na pata de ratos. Os resultados mostraram que a atividade antiinflamatória da fração isolada do

plasma afetou tanto no desenvolvimento do edema como na infiltração de proteínas plasmáticas no teste de edema na pata induzido por CG.

VINEGAR *et al.* (1987) realizando o teste da inflamação induzida por CG na pata de ratos, concluíram, a partir de análises histológicas, que a resposta inflamatória da CG era composta por duas fases. O exame histológico do tecido subplantar (s.p.) tratado era realizado em dois períodos: aos 20 minutos ou aos 180 minutos após a injeção da CG. No primeiro período, não foi detectada nenhuma alteração celular, quando comparado aos tecidos não tratados (controle). Enquanto que no segundo período, foram observados intensa resposta inflamatória fagocítica (RIF) com grande número de neutrófilos e edema tissular, a qual era precedida por uma resposta inflamatória não fagocítica (RINF).

Além disso, tem sido demonstrado que o CGRP e a SP podem desempenhar um papel nas respostas inflamatórias neurogênicas. Estudos em ratos imunizados com CGRP mostrou um efeito desse peptídeo sobre as respostas à inflamação induzida por óleo de mostarda (OM), na qual acredita-se ter um componente neurogênico. Enquanto que naquela induzida pela CG,

esse efeito não foi observado fundamentando a idéia de que a inflamação induzida pela CG é do tipo não neurogênica (LOUIS *et al.*, 1989).

Posteriormente, na tentativa de melhor compreender a produção de mediadores inflamatórios e a sua liberação na doença articular inflamatória, estabeleceram um modelo de inflamação aguda na ATM de coelhos (SWIFT *et al.*, 1998). Neste modelo, o efeito de duas drogas antiinflamatórias na modulação dos níveis tissulares de dois mediadores inflamatórios (PGE<sub>2</sub> e BK) foi verificado. Assim, o teste da CG na ATM de coelhos foi utilizado para promover uma inflamação, a qual foi verificado através de um aumento significativo na temperatura da articulação. O cetorolaco, um antiinflamatório não esteroideal (AINE), e a dexametasona eram administradas ou sistemicamente (i.p.) ou localmente (i.a.) e foi verificado que o cetorolaco conseguiu reduzir os níveis tanto da PGE<sub>2</sub> como a da BK, enquanto que a dexametasona reduziu apenas os níveis de BK.

TONUSSI & FERREIRA (1999), estudaram a relação do TNF- $\alpha$ , uma citocinina com grande potencial no desenvolvimento da hiperalgisia inflamatória, com a inflamação induzida pela CG em joelho de ratos. Os

resultados obtidos pelos autores sugerem que o TNF- $\alpha$  seja um importante mediador da resposta algésica no teste da CG na articulação de joelho de ratos.



# *Objetivos*



### **3. OBJETIVOS**

- ✓ Verificar o efeito da histamina e a participação dos receptores histaminérgicos periféricos do tipo H<sub>1</sub> no processo de nocicepção proveniente da ATM de ratos.
  
- ✓ Verificar o efeito da associação da histamina e da serotonina na sensibilização de nociceptores da ATM de ratos.
  
- ✓ Verificar se a administração de histamina na ATM de ratos previamente sensibilizada pela carragenina altera a nocicepção.



# *Material e Métodos*



## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. ANIMAIS**

Para realização deste trabalho foram utilizados 138 ratos Wistar pesando entre 150 a 250g, provenientes do CEMIB-UNICAMP. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas (5 por gaiola) contendo maravalha, em ambiente com controle de luminosidade (ciclos claro/escuro de 12h) com alimentação e água, *ad libitum*.

Todos os procedimentos experimentais foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Estadual de Campinas (**ANEXO 1**) e seguiram as diretrizes propostas pelo Comitê para Pesquisa e Ética da Associação Internacional para Estudo da Dor em animais conscientes (ZIMMERMANN, 1983). Em particular, a duração dos experimentos foi a menor possível (30 minutos) e o número de ratos usados foi mantido ao mínimo necessário (aproximadamente 8 ratos por grupo).

## **4.2. PROCEDIMENTOS GERAIS**

As sessões de teste foram realizadas durante a fase clara entre 9h e 17h em sala silenciosa, com temperatura ambiente mantida a 25°C (ROSLAND, 1991). Durante o período de teste os ratos não tiveram acesso à água ou à comida. Para minimizar o estresse durante as sessões experimentais, os ratos foram previamente manipulados pelo pesquisador por um período de 7 dias.

Para a realização das análises comportamentais uma caixa de observação medindo 30x30x30cm com base e 3 laterais espelhadas e frente de vidro foi utilizada. Cada rato foi inicialmente colocado e mantido na caixa por 10 minutos para habituar-se ao ambiente de experimentação e minimizar o estresse (ABBOTT *et al.*, 1986).

## **4.3. INJEÇÕES NA REGIÃO DA ATM**

Para administração de drogas na região da ATM esquerda, os ratos foram anestesiados por inalação de Halotano. A seguir, uma agulha calibre 30, conectada a uma seringa de microlitro Hamilton (50µL) por um tubo de

polietileno P50, foi inserida na porção inferior da borda pósterio-inferior do arco zigomático, sendo avançada em direção anterior até contactar a região pósterio-lateral do côndilo (FIG. 4). As soluções contendo drogas isoladas ou associadas foram administradas num volume total de 50 $\mu$ L na ATM.



**FIGURA 4** – Administração da droga na ATM do animal: posição de inserção da agulha hipodérmica calibre 30 que está conectada a uma seringa de microlitro Hamilton por meio de uma cânula de polietileno P50.

#### **4.4. TESTE COMPORTAMENTAL**

Imediatamente após a administração periarticular de drogas os animais, já conscientes, foram recolocados na câmara de observação e as respostas comportamentais caracterizadas pelo ato de coçar a região injetada

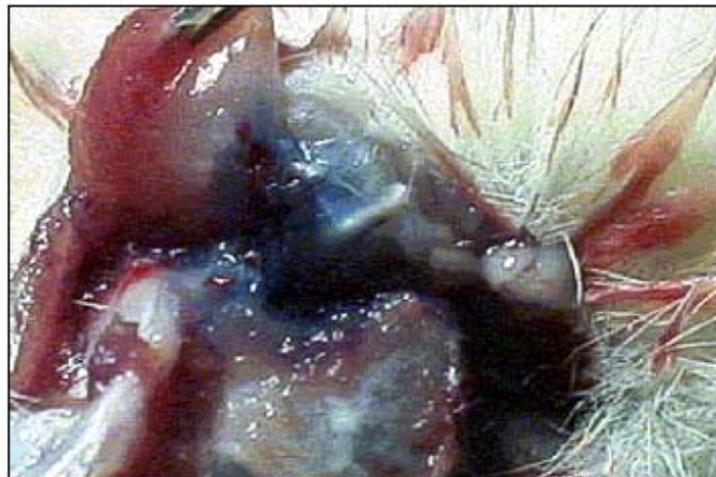
com a pata dianteira ou traseira e pelo ato de levantar reflexamente a cabeça foram quantificadas durante o período de 30 minutos, divididos em 10 blocos de 3 minutos cada (**ANEXO 2**). O tempo em segundos que os animais permaneceram coçando a região orofacial foi quantificado através da utilização de um cronômetro, e o número de vezes que o animal levantou reflexamente a cabeça foi quantificado por um contador de células, como anteriormente descrito (ROVERONI *et al.*, 2001).

Considerando que o ato de levantar reflexamente a cabeça segue um padrão uniforme de 1 segundo de duração, a intensidade da resposta nociceptiva foi quantificada somando-se esse comportamento ao ato de coçar a região injetada, como previamente padronizado (ROVERONI *et al.*, 2001).

#### **4.5. CONFIRMAÇÃO DO LOCAL DA INJEÇÃO NA ATM**

Após o término de cada análise comportamental foi realizada a confirmação visual do local da administração das drogas (*pos-mortem*). Para isso, após indução anestésica com cloridrato de tiazina 2% (5mg/kg, intramuscular) seguido de cloridrato de ketamina 10% (10mg/kg, intramuscular), o corante azul de Evans (1%; 5mg/kg) foi injetado,

intracardiamente. Após dez minutos, o animal foi submetido à perfusão cardíaca com soro fisiológico para facilitar a visualização da região da ATM (FIG. 5). Como o corante Azul de Evans se liga às proteínas plasmáticas, o local da injeção foi identificado visualmente, onde ocorreu o extravasamento plasmático (HAAS *et al.*, 1992).



**FIGURA 5** – Visualização do sítio de injeção da droga: ATM dissecada após o sacrifício, confirmando o local de administração da droga (contraste visual devido ao corante Azul de Evans).

#### 4.6. SOLUÇÕES E DOSES EMPREGADAS

- **Solução salina:** NaCl 0,9 % (HalexIstar)
- **Carragenina** (Sigma): dissolvido em salina (100µg/50µL)
- **Histamina 2HCl** (RBI): dissolvido em salina (100, 250 ou 500µg/50µL)
- **Maleato de Pirilamina** (RBI): dissolvido em salina (400µg/25µL)
- **5-Hidroxitriptamina** (Sigma): dissolvido em salina (100, 250 ou 500µg/50µL)
- **QX-314**, um derivado quaternário da lidocaína hidrofílica (Sigma, MO,USA): preparado a 4% em 25µL de salina
- **Azul de Evans** (Sigma): dissolvido em salina, preparado numa concentração de 1,0% e administrado na dose de 5mg/kg
- **Solução anestésica:** *Cloridrato de Ketamina 2%* (AGRIBRANDS) administrado na dose de 5mg/kg e *Cloridrato de Tiazina 10%* (BAYER) administrado na dose de 10mg/kg

## **4.7. GRUPOS EXPERIMENTAIS**

Para realização deste trabalho, os animais foram divididos de forma aleatória em diferentes grupos experimentais.

### ***4.7.1. EFEITO NOCICEPTIVO DA ADMINISTRAÇÃO DE HISTAMINA NA REGIÃO DA ATM DE RATOS***

Nesta fase inicial, para se determinar o papel da histamina como agente desencadeante de nocicepção quando administrada na ATM, salina 0,9% (n=14) ou histamina nas diferentes concentrações (100µg, n=6; 250µg, n=7; 500µg, n=10) foram administradas na região da ATM de ratos, verificando-se a relação dose-resposta em comparação com o grupo tratado com salina.

Para se confirmar o carácter nociceptivo das respostas comportamentais induzidas pela administração de histamina na ATM, foi realizado um grupo adicional onde o anestésico local, QX-314 (4%, 25µL), foi co-administrado com a histamina na sua dose mais efetiva (n=8).

Para confirmar se as respostas comportamentais induzidas pela injeção de histamina na região da ATM são realmente mediadas pela ativação dos receptores histaminérgicos, o antagonista do receptor H<sub>1</sub>, pirilamina (400µg/25µL), foi co-administrado com a histamina também na dose mais efetiva (n=10).

### ***3.7.2. EFEITO DA HISTAMINA NA SENSIBILIZAÇÃO DOS NOCICEPTORES DA ATM DE RATOS.***

Para verificar o papel da histamina na sensibilização dos nociceptores da ATM foi utilizado um outro agente comumente presente na mediação da dor: serotonina. A serotonina foi administrada na ATM de ratos nas diferentes concentrações para se obter uma curva dose-resposta (100µg, n=10; 250µg, n=6; 500µg n=7), e comparadas com o grupo tratado com salina (n=14).

Posteriormente, a dose sublimiar de serotonina, dose esta insuficiente para produzir respostas comportamentais nociceptivas, foi co-administrada com histamina também na sua dose sublimiar (n=8).

### ***3.7.3. ADMINISTRAÇÃO DE HISTAMINA NA ATM DE RATOS PREVIAMENTE SENSIBILIZADA PELA CARRAGENINA.***

Para se estudar o papel da histamina na articulação sensibilizada pelo agente hiperalgésico carragenina, foram realizados os grupos com tratamento prévio de carragenina (100µg) e uma hora após, salina 0,9% (n=9) ou histamina, na dose sublimiar, (n=8) foi administrada na mesma ATM.

Para se ter a comprovação de que a ATM foi previamente sensibilizada pela carragenina, a serotonina na sua dose sublimiar (n=8) foi administrada uma hora após o tratamento com a carragenina. Foram também realizados grupos adicionais com tratamento prévio de salina 0,9% e uma hora após administração de salina 0,9% (n=6) ou serotonina, dose sublimiar, (n=6) que serviram como grupos controles.

#### **4.8. ANÁLISE DE DADOS**

Os dados com homogeneidade de variância foram analisados através da aplicação do teste estatístico One-Way Análise de Variância (ANOVA). Comparações múltiplas foram realizadas aplicando-se o teste de TUKEY e o nível de significância foi estabelecido em  $p \leq 0,05$ . Os dados estão apresentados pela média  $\pm$  o Erro Padrão da Média (E.P.M.). O programa SIGMA STAT foi utilizado para a realização dos cálculos estatísticos.

# *Resultados*



## **5. RESULTADOS**

### **5.1. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE HISTAMINA NA REGIÃO DA ATM DE RATOS**

A administração de histamina na ATM (250µg) promoveu uma resposta comportamental significativamente maior que a induzida pela administração de salina sugerindo que a histamina induz nocicepção na ATM. Como a resposta induzida pela dose de 250µg também foi significativamente maior que a induzida pela de 100µg (TAB. 1a e GRAF. 1a), a dose de 100µg foi caracterizada como dose sublimiar (dose insuficiente para produzir resposta nociceptiva) e posteriormente combinada com uma dose também sublimiar de serotonina no estudo do efeito nociceptivo da histamina. Embora a resposta induzida pela histamina na dose de 500µg tenha sido menor que a induzida pela de 250µg não houve diferença estatística entre essas duas doses.

A TAB. 1b e GRAF. 1b mostram que a co-administração do derivado quaternário da lidocaína hidrofílica (QX-314, 4%) ou do antagonista do receptor histaminérgico do tipo H<sub>1</sub> (pirilamina, 400µg), com a histamina (250µg) reduziu significativamente a resposta comportamental induzida pela

histamina, confirmando que o efeito nociceptivo induzido pela histamina é local e mediado pela ativação de receptores histaminérgicos funcionais do tipo  $H_1$  presentes na região da ATM de ratos, respectivamente.

**TABELA 1a** – Efeito da administração de histamina na região da ATM de ratos.

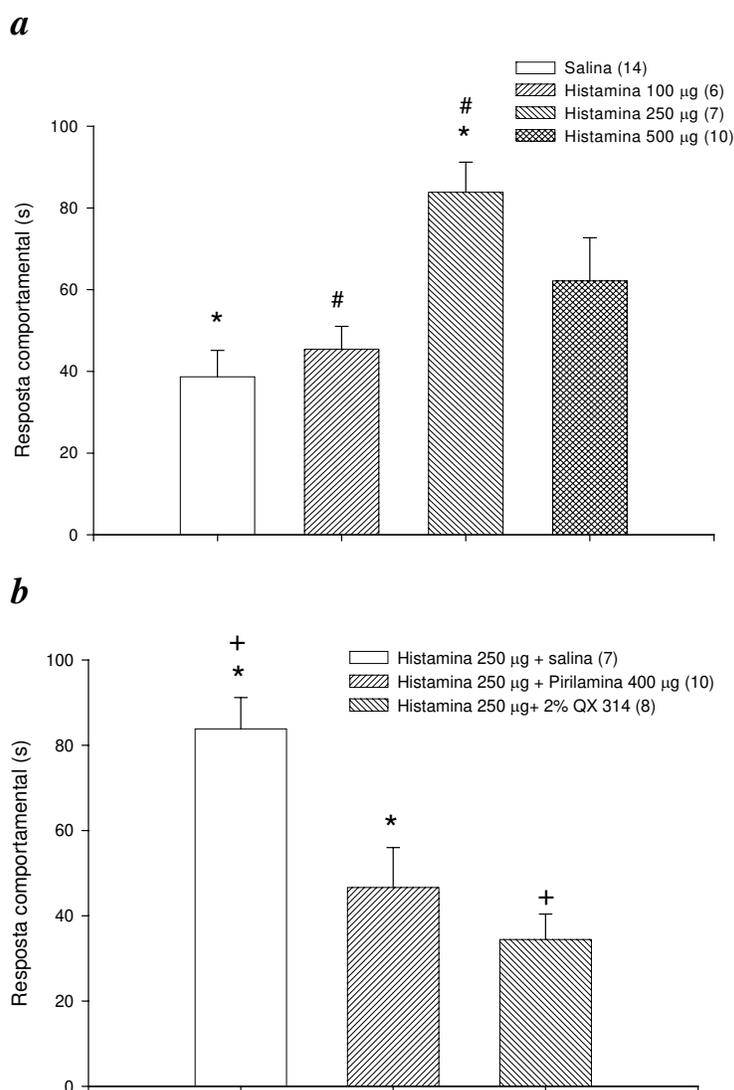
GRUPOS	Resposta Comportamental (s)
Salina (n=14)	38,67 ± 6,22 *
Histamina 100µg (n=6)	45,42 ± 5,10 #
Histamina 250µg (n=7)	83,83 ± 6,80 *#
Histamina 500µg (n=10)	62,13 ± 10,04

Símbolos iguais indicam diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ; teste Tukey) entre grupos. Dados expressos como média ± E.P.M.

**TABELA 1b** – Efeito da co-administração do antagonista do receptor histaminérgico do tipo  $H_1$  (pirilamina) ou do derivado quaternário da lidocaína (QX-314), com histamina.

GRUPOS	Resposta Comportamental (s)
Histamina 250µg (n=7)	83,83 ± 6,80 + *
Histamina 250µg + Pirilamina 400µg (n=10)	46,62 ± 8,89 *
Histamina 250µg + QX-314, 4% (n=8)	34,44 ± 5,56 +

Símbolos iguais indicam diferença significativa ( $p \leq 0,05$ , Teste Tukey) entre grupos. Dados expressos como média ± E.P.M.



**GRÁFICO 1** – Efeito da administração de histamina na região da ATM de ratos. **a.** A administração de histamina (250µg) na região da ATM induziu resposta nociceptiva. **b.** A co-administração do antagonista do receptor histaminérgico do tipo H<sub>1</sub> (pirilamina) ou a do derivado quaternário da lidocaína (QX-314, 4%) com histamina, reduziu significativamente a resposta nociceptiva induzida pela mesma. Nesta figura, assim como nas subsequentes, cada coluna representa média ± E.P.M., o número entre parênteses representa o “n” de cada grupo e símbolos iguais sobre diferentes colunas indicam diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ; teste Tukey) entre grupos.

## **5.2. ESTUDO DO EFEITO NOCICEPTIVO DA HISTAMINA NA ATM DE RATOS.**

Para estudar o efeito nociceptivo da histamina na ATM, a dose sublimiar de histamina (100 $\mu$ g) foi co-administrada com uma dose sublimiar de serotonina (100 $\mu$ g) determinada a partir da curva dose-resposta da serotonina (veja TAB. 2a e GRAF. 2a). Como pode ser observado a administração de serotonina na ATM (250 $\mu$ g) promoveu uma resposta comportamental significativamente maior que a induzida pela administração de salina sugerindo que a serotonina induz dor na ATM. Como a resposta induzida pela dose de 250 $\mu$ g também foi significativamente maior que a induzida pela de 100 $\mu$ g (TAB. 2a e GRAF. 2a), a dose de 100 $\mu$ g foi caracterizada como dose sublimiar e combinada com a dose sublimiar de histamina (100 $\mu$ g). A TAB. 2b e GRAF. 2b mostram que a co-administração da dose sublimiar de histamina com a de serotonina desencadeou uma resposta comportamental significativamente maior que a induzida pela administração de cada uma delas individualmente, sugerindo que a histamina e a serotonina agem sinergicamente na indução nociceptiva na ATM.

**TABELA 2a** – Efeito da administração de serotonina na região da ATM induzindo resposta nociceptiva.

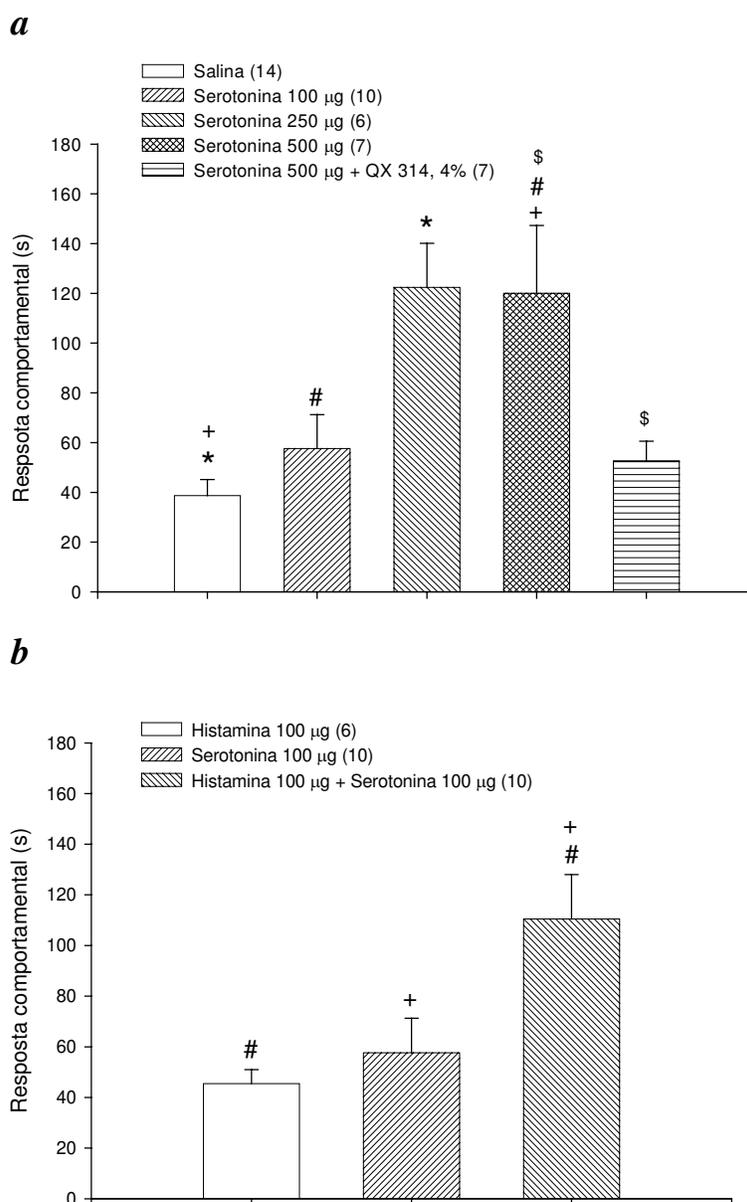
GRUPOS	Resposta Comportamental (s)
Salina (n=14)	38,67 ± 6,22 * <sup>+</sup>
Serotonina 100µg (n=10)	57,64 ± 12,93 <sup>#</sup>
Serotonina 250µg (n=6)	122,43 ± 16,19 *
Serotonina 500µg (n=7)	120,08 ± 25,21 <sup>+ # \$</sup>
Serotonina 500µg + QX-314, 4% (n=7)	52,71 ± 7,27 <sup>\$</sup>

Símbolos iguais indicam diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ; teste de Tukey) entre grupos. Dados expressos como média ± E.P.M.

**TABELA 2b** – Efeito da co-administração de uma dose sublimiar de serotonina (100µg) com uma dose sublimiar de histamina (100µg) na região da ATM de ratos.

GRUPOS	Resposta Comportamental (s)
Histamina 100µg (n=6)	45,42 ± 5,10 <sup>#</sup>
Serotonina 100µg (n=10)	57,64 ± 12,93 <sup>+</sup>
Histamina 100µg + Serotonina 100µg (n=8)	110,52 ± 16,58 <sup># +</sup>

Símbolos iguais indicam diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ; Teste de Tukey) entre grupos. Dados expressos como média ± E.P.M.



**GRÁFICO 2** – Efeito nociceptivo da histamina. **a.** A administração de serotonina na região da ATM induziu resposta nociceptiva. **b.** A co-administração de uma dose sublimiar (dose insuficiente para produzir resposta nociceptiva) de serotonina (100µg) com uma dose sublimiar de histamina (100µg) na região da ATM de ratos produziu resposta nociceptiva.

### **5.3. PAPEL DA HISTAMINA NA ATM PREVIAMENTE SENSIBILIZADA PELA ADMINISTRAÇÃO DE CARRAGENINA.**

Para comprovar que a carragenina (100 $\mu$ g) sensibilizou a ATM a TAB. 3a e GRAF. 3a mostra: *1*) que a administração de carragenina não produziu uma resposta comportamental significativamente maior que a induzida pela administração de salina (veja as 2 primeiras colunas do gráfico); *2*) que a administração de uma dose sublimiar de serotonina (100 $\mu$ g) 1 hora após a administração de carragenina (100 $\mu$ g) na ATM produziu uma resposta comportamental significativamente maior que a induzida pela administração de carragenina ou serotonina (veja 3 últimas colunas do gráfico). A TAB. 3b e GRAF. 3b mostram que a administração da dose sublimiar de histamina (100 $\mu$ g), uma hora após a administração do agente hiperalgésico carragenina (100 $\mu$ g) não desencadeou uma resposta comportamental significativamente maior que a induzida pela administração de apenas carragenina ou histamina. Esse resultado sugere que a histamina não induziu resposta nociceptiva quando administrada na ATM previamente sensibilizada pela carragenina.

**TABELA 3a** – Comprovação do efeito de sensibilização da ATM pela administração de carragenina.

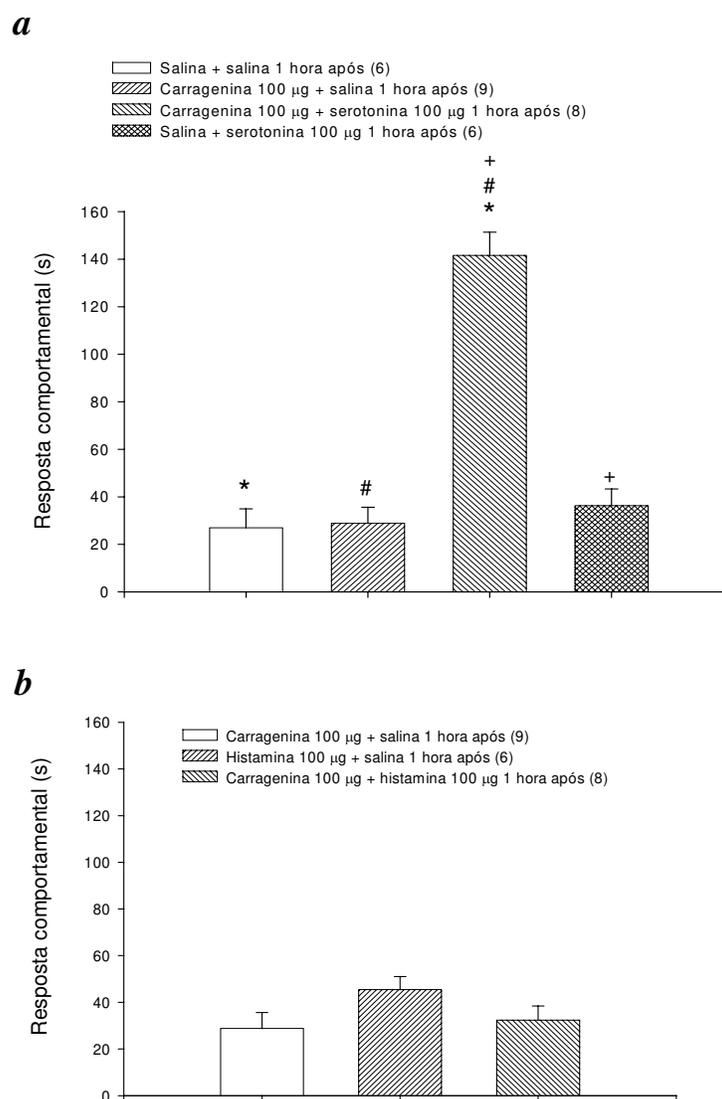
GRUPOS	Resposta Comportamental (s)
Salina + Salina 1hora após (n=6)	26,96 ± 7,30 *
Carragenina 100µg + Salina 1hora após (n=9)	28,83 ± 6,37 #
Carragenina 100µg + Serotonina 100µg 1hora após (n=8)	141,57 ± 9,15 * # +
Salina + Serotonina 100µg 1hora após (n=6)	36,27 ± 6,45 +

Símbolos iguais indicam diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ; Teste de Tukey) entre grupos. Dados expressos como média ± E.P.M.

**TABELA 3b** – Efeito da administração de histamina na ATM previamente sensibilizada pela administração de carragenina na região da ATM de ratos.

GRUPOS	Resposta Comportamental (s)
Carragenina 100µg + Salina 1h após (n=9)	28,83 ± 6,37
Histamina 100µg + Salina 1h após (n=6)	45,42 ± 5,10
Carragenina 100µg + Histamina 100µg 1hora após (n=8)	32,33 ± 5,66

Dados expressos como média ± E.P.M. ( $p > 0,05$ ; Teste de Tukey)



**GRÁFICO 3** – Efeito da administração de histamina na ATM previamente sensibilizada pela administração de carragenina na região da ATM de ratos. **a.** Comprovação de que a carragenina sensibiliza a ATM, uma vez que a administração de uma dose sublimiar de serotonina (100µg) 1 hora após a administração de carragenina na região da ATM de ratos produziu uma resposta comportamental significativamente maior que a induzida pela administração de carragenina ou serotonina. **b.** A administração de uma dose sublimiar de histamina (100µg) 1 hora após a administração de carragenina na região da ATM de ratos não induziu uma resposta comportamental significativamente maior que a induzida pela administração de carragenina ou histamina.



# *Discussão*



## **6. DISCUSSÃO**

Quando ocorre uma lesão tecidual, os mediadores inflamatórios liberados do tecido, células sanguíneas e de terminais neurais, atuam diretamente nos nociceptores da fibra aferente primária causando dor ou amplificando as respostas dolorosas desencadeadas por outros estímulos (sensibilização) (WALL & MELZACK, 1999). A histamina é uma dessas substâncias liberadas pelas células do local lesionado e que ativa diretamente os nociceptores da fibra aferente primária (KANDEL *et al.*, 2003).

Já é conhecido na literatura através de estudos pioneiros em animais e em humanos que a aplicação de diferentes concentrações de histamina no tecido subcutâneo ou na córnea, induz dor através da ativação das fibras aferentes primárias que inervam estes locais (ROSENTHAL & MINARD, 1939). Similarmente, BROTON & SESSLE (1988) verificaram através de estudos eletromiográficos que a administração de histamina na ATM de gatos promovia um aumento significativo na atividade dos músculos da mastigação (digástrico anterior, temporal e genioglosso) quando comparados com a administração de salina. Diante disso, os autores sugeriram que a histamina

poderia estar participando da dor e da disfunção da ATM, uma vez que na disfunção a atividade reflexa dos músculos está aumentada.

No presente trabalho, através da utilização do modelo comportamental desenvolvido por ROVERONI *et al.* (2001), foi demonstrado que a administração de histamina na ATM de ratos induziu resposta nociceptiva na dose de 250µg. Como numa dose maior (500µg) verificou-se uma leve diminuição das respostas comportamentais, é possível que em doses elevadas, a histamina também atue em células presentes no líquido sinovial (linfócito por exemplo) e reduza conseqüentemente a síntese de outros mediadores como a interleucina-6 (IL-6) (TANAKA *et al.*, 1997).

Considerando que a histamina tem sido relatada como um agente algogênico e está presente em diversas situações fisiopatológicas, estudos foram sendo realizados utilizando-se de anti-histamínicos para se verificar um efeito analgésico dos mesmos (RUMORE & SCHILICHTING, 1985). Os efeitos antinociceptivos foram verificados nos trabalhos de MALMBERG-AIELLO *et al.* (1998), no qual animais tratados s.c. com anti-histamínico (maleato de pirilamina) obtiveram uma resposta dolorosa diminuída quando submetidos aos testes da placa quente e da pressão da pata ou no trabalho de

MOBARAKEH *et al.* (2000), onde camundongos com genes nocautes para a síntese de receptores histaminérgicos do tipo H<sub>1</sub>, apresentavam-se com sensibilidade para dor significativamente diminuída em relação aos camundongos selvagens, quando avaliados nos testes da placa quente, *tail-flick* (retirada da cauda), pressão da cauda, pressão da pata, formalina e capsaicina. Esse efeito antinociceptivo dos anti-histamínicos também foi observado no teste da formalina da ATM através da co-administração de pirilamina (antagonista seletivo do receptor H<sub>1</sub>) com o agente nociceptivo formalina na região da ATM de ratos (ROVERONI, 1999). Esse trabalho demonstrou pela primeira vez a existência de receptores funcionais histaminérgicos na ATM de ratos.

O fato da resposta nociceptiva desencadeada pela administração de histamina na região da ATM de ratos ter sido revertida no presente trabalho pela co-administração de pirilamina confirma a existência de receptores histaminérgicos do tipo H<sub>1</sub> na ATM de ratos e demonstra a especificidade do efeito desencadeado pela histamina para com os receptores histaminérgicos.

Assim como a histamina, a serotonina também é um mediador que tem a propriedade de ativar os nociceptores das fibras nociceptivas aferentes

primárias. Tem sido demonstrado que a administração subcutânea (s.c.) de serotonina promove uma intensa resposta nociceptiva caracterizada pelos comportamentos de levantamento rápido da pata seguida de sacudidas (*flinch*) e lambida da pata (*licking*) (CARSTENS, 1997; HONG & ABBOTT, 1994).

De modo semelhante, o efeito nociceptivo da serotonina também foi verificado neste trabalho, mas ao contrário da histamina, a serotonina provocou dor numa relação dose-dependente (a partir de 250 $\mu$ g). Esses dados sugerem que a serotonina ativa nociceptores localizados na região da ATM para produzir dor, uma vez que a resposta nociceptiva desencadeada pela mesma foi bloqueada pela co-administração do anestésico local (QX-314, 2%).

PARADA *et al.* (2001) verificaram que além da histamina, a serotonina também está envolvida na resposta nociceptiva induzida pela formalina, uma vez que a administração de antagonistas seletivos do receptor serotoninérgico diminuiu de forma significativa as respostas nociceptivas induzidas pela administração de formalina na pata de ratos. Além disso, os mesmos autores verificaram, que a co-administração de uma dose sublimiar de histamina com uma dose também sublimiar de serotonina, induzia uma

resposta nociceptiva, sugerindo que essas substâncias atuem sinergicamente na indução da dor. Sabe-se que a histamina e a serotonina são sintetizadas e armazenadas em diferentes grânulos do mastócito (HENSEN, 1974) e que durante uma lesão tecidual, ambas podem ser liberadas, e ainda, que a presença desses mediadores (histamina e serotonina) é capaz de ativar a fibra C fazendo com que esta libere outros mediadores como a substância P e CGRP, e estes, por sua vez, são capazes de induzir uma maior desgranulação de mastócitos (FIG. 3; LENT, 2001), resultando num aumento da concentração de mediadores no local da lesão intensificando e prolongando a nocicepção. Dessa forma, é possível que o efeito nociceptivo induzido pela administração de histamina (250µg) na ATM seja decorrente da somatória de um efeito direto, caracterizado pela ativação de receptores H<sub>1</sub> presentes nos nociceptores das fibras aferentes da ATM, e indireto, via desgranulação dos mastócitos. Nesse contexto, a participação da serotonina é relevante, e como demonstrado neste trabalho a co-administração de histamina com serotonina, ambas em doses sublimiáres (100µg), foi capaz de promover dor na ATM de ratos.

As condições de dor inflamatória no homem são de grande relevância e o estudo de seus mecanismos tem sido a essência para o

desenvolvimento de novas drogas para o controle das condições dolorosas (SIQUEIRA & TEIXEIRA, 2001). Para isso, modelos experimentais em animais vêm sendo desenvolvidos e padronizados para possibilitar o estudo dessas condições dentro das leis estabelecidas pela Ética. O teste com carragenina é um exemplo disso, ela promove uma inflamação do tipo não neurogênica cujo efeito nociceptivo pode ser inibido através da inibição da síntese de eicosanóides e do bloqueio dos receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos (NAKAMURA & FERREIRA, 1987), semelhando-se assim a uma das principais condições inflamatórias presenciadas no homem.

Sendo assim, neste trabalho observou também que a sensibilização do neurônio periférico da ATM pela carragenina aumenta a sua susceptibilidade à nocicepção induzida pela serotonina, mas não pela histamina. Isso sugere que a serotonina possui uma capacidade de ativação do nociceptor mais intensa quando comparada com a histamina. Nesse contexto, o fato da administração da histamina ter provocado resposta nociceptiva numa dose equivalente à da serotonina (250 $\mu$ g) parece ser um contra-senso considerando o efeito de ambas as drogas no neurônio sensibilizado pela carragenina. Entretanto, ao contrário da serotonina que provocou comportamento nociceptivo de forma dose-dependente, a histamina induziu

resposta nociceptiva apenas na dose de 250µg, conforme visto anteriormente, sugerindo que a histamina quando administrada na ATM deve também ter um efeito indireto na indução da nocicepção.

Tem sido demonstrado que a histamina é um mediador da dor no Sistema Nervoso Central (RUMORE & SCHILINCHTING, 1985; GALEOTTI *et al.*, 2002). Alguns trabalhos realizados em humanos, durante cirurgia dentária, sugeriram um efeito analgésico periférico dos anti-histamínicos (BELLVILLE *et al.*, 1979). Como o nosso estudo demonstrou que na inflamação provocada por administração de carragenina (inflamação mediada por eicosanóides e aminas simpatomiméticas) a histamina não induz comportamento nociceptivo, provavelmente a dose utilizada no estudo da ação analgésica do anti-histamínico foi uma dose sistêmica.

A comprovação da existência de receptores H<sub>1</sub> periféricos na ATM e a evidência de sinergismo entre a histamina e a serotonina no processo de nocicepção poderia sugerir formas alternativas de tratamento para o alívio da dor associada às DTMs.

Os antagonistas de receptores  $H_1$  associados aos antagonistas de receptores serotoninérgicos podem exercer um efeito anti-hiperalgésico local via mecanismos periféricos que seria de relevância por minimizar os efeitos colaterais indesejáveis da ação central dessas drogas.

# *Conclusões*



## **7. CONCLUSÕES**

✓ A histamina induz uma resposta nociceptiva na ATM de ratos na dose de 250µg de forma direta através da ativação de receptores histaminérgicos do tipo H<sub>1</sub> periféricos.

✓ A histamina exerce um efeito sinérgico com a serotonina na sensibilização de nociceptores da ATM de ratos.

✓ A histamina não altera a nocicepção quando administrada na ATM de ratos previamente sensibilizada pela carragenina.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABBOTT, F.V.; FRANKLIN, K.B.J.; CONNELL, B. The stress of a novel environment reduces formalin pain: possible role of serotonin. **Eur J Pharmacol**, Amsterdam, v. 126, n.1-2, p. 141-144, 1986.
2. 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.
3. AGHABEIGI, B. The pathophysiology of pain. **Br Dent J**, London, v.173, n.3, p.91-97, Aug. 1992.
4. ALDER, M.E. *et al.* Magnetic resonance spectroscopy of inflammation associated with the temporomandibular joint. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, St Louis, v.74, n.4, p.515-523, Oct. 1992.
5. BARON, R. *et al.* Histamine-induced itch converts into pain in neuropathic hyperalgesia. **Neuroreport**, Philadelphia, v.12, n.16, p.3475-3478, Nov. 2001.
6. BELL, W.E. **Orofacial pain**. Classification, diagnosis, management. 4<sup>th</sup> ed. Chicago: Year Book Medical Publishers, 1989, p.101-113.
7. BELLVILLE, J.W. *et al.* Analgesic effects of hydroxyzine compared to morphine in man. **J Clin Pharmacol**, Philadelphia, v.19, n.5-6, p.290-296, 1979.

8. BERTHOLD, C.W.; DIONNE, R.A. Clinical evaluation of H<sub>1</sub>-receptor and H<sub>2</sub>-receptor antagonists for acute postoperative pain. **J Clin Pharmacol**, Philadelphia, v.33, n.10, p.944-948, Oct. 1993.
9. BERVOETS, K.; MILLAN, M.J.; COLPAERT, F.C. Agonist action at 5-HT<sub>1C</sub> receptors facilitates 5-HT<sub>1A</sub> receptor-mediated spontaneous tail-flicks in the rat. **Eur J Pharmacol**, Amsterdam, v.191, n.2, p.185-195, Nov. 1990.
10. BOLAM, J.P. *et al.* Histamine, 5-hydroxytryptamine, kinins and the anti-inflammatory activity of human plasma fraction in carrageenan-induced paw oedema in the rat. **J Pharm Pharmacol**, London, v.26, n.6, p.434-440, Nov. 1974.
11. BROMLEY, M.; WOOLLEY, D.E. Histopathology of the rheumatoid lesion. Identification of cell types at sites of cartilage erosion. **Arthritis Rheum**, Philadelphia, v.27, n.8, p.857-863, Aug. 1984.
12. BROTON, J.G.; HU, J.W.; SESSLE, B.J. Effects of temporomandibular joint stimulation on nociceptive and nonnociceptive neurons of the cat's trigeminal subnucleus caudalis (medullary dorsal horn). **J Neurophysiol**, Bethesda, v.59, n.5, p.1575-1589, May 1988.
13. BROTON, J.G.; SESSLE, B.J. Reflex excitation of masticatory muscles induced by algescic chemicals applied to the temporomandibular joint of the cat. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.33, n.10, p.741-747, 1988.

14. CARDENAS, C.G. *et al.* 5-HT<sub>4</sub> receptors couple positively to tetrodotoxin-insensitive sodium channels in a subpopulation of capsaicin-sensitive rat sensory neurons. **J Neurosci**, Washington, v.17, n.19, p.7181-7189, Oct. 1997.
15. CARSTENS, E. Responses of rat spinal dorsal horn neurons to intracutaneous microinjection of histamine, capsaicin, and other irritants. **J Neurophysiol**, Bethesda, v.77, n.5, p.2499-2514, May 1997.
16. CHENITZ, J.E. Rheumatoid arthritis and its implications in temporomandibular disorders. **Cranio**, Chattanooga, v.10, n.1, p.59-69, Jan. 1992. Review.
17. CLARK, G.T. Diagnosis and treatment of painful temporomandibular disorders. **Dent Clin North Am**, Philadelphia, v.31, n.4, p.645-674. Oct, 1987. Review.
18. CLARK, G.T.; SOLBERG, W.K.; MONTEIRO, A.A. Temporomandibular disorders: New challenges in clinical management, research and teaching. In: CLARK, G.T.; SOLBERG, W.K. (Ed) **Perspectives in temporomandibular**. Chicago: Quintessence International, 1987.
19. CLAVELOU, P. *et al.* Applications of the formalin test to the study of orofacial pain in the rat. **Neurosci Lett**, Clare, v.103, n.3, p.349-353, Sept. 1989.

20. 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.
21. 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. Review.
22. COELHO, A.M.; FIORAMONTI, J.; BUENO, L. Mast cell degranulation induces delayed rectal allodynia in rats: role of histamine and 5-HT. **Digest Dis Sci**, New York, v.43, n.4, p.727-737, Apr. 1998.
23. 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. Review.
24. COSTEN, J. Neuralgias and ear symptoms associated with disturbed function of the temporomandibular joint. **J Am Med Assoc**, p.107-252, 1934.
25. CRISP, A.J. *et al.* Articular mastocytosis in rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, Philadelphia, v.27, n.8, p.845-851, Aug. 1984.
26. DEWS, P.B.; GRAHAM, J.P. The antihistamine substance 2786 RP. **Brit J Pharmacol Chemother**, Hampshire, v.1, n.4, p.278-286, 1946.
27. DRAY, A. Inflammatory mediators of pain. **Br J Anaesth**, London, v.75, n.2, p.125-131, Aug. 1995. Review.

28. DUBNER, R.; BENNETT, G.J. Spinal and trigeminal mechanisms of nociception. **Annu Rev Neurosc**, Palo Alto, v.6, p.381-418, 1983. Review.
29. DUBUISSON, D.; DENNIS, S.G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain**, Amsterdam, v.4, n.2, p.161-174, Dec 1977.
30. DWORKIN, S.F. *et al.* Epidemiology of signs and symptoms in temporomandibular disorders: I. Clinical signs in cases and controls. **J Am Dent Assoc**, Chicago, v.120, n.3, p.273-281, Mar. 1990.
31. EGLIN, R.M. *et al.* The 5-HT<sub>7</sub> receptor: orphan found. **Trends Pharmacol Sci**, Oxford, v.18, n.4, p.104-107, Apr. 1997. Review.
32. FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q.; HYSLOP, S. Role of the inducible forms of cyclooxygenase and nitric oxide synthase in inflammatory pain. **Induc Enz Inflam Resp**, p.149-167, 1999.
33. FOREMAN, J.; JORDAN, C. Histamine release and vascular changes induced by neuropeptides. **Agents Actions**, Basel, v.13, n.2-3, p.105-116, Apr. 1983.
34. FRANKLIN, K.B.J.; ABBOTT, F.V. Pentobarbital, diazepam and ethanol abolish the inter-phase diminution of pain in the formalin test: evidence for pain modulation by GABA<sub>A</sub> receptors. **Pharmacol Biochem Behav**, Oxford, v.46, n.3, p.661-666, Nov. 1993.

35. FREWIN, D.B. *et al.* Histamine levels in human synovial fluid. **J Rheumatol**, Toronto, v.13, n.1, p.13-14, Feb. 1986.
36. GALEOTTI, N.; GHELARDINI, C.; BARTOLINI, A. Antihistamine antinociception is mediated by Gi-protein activation. **Neuroscience**, Oxford, v.109, n.4, p.811-818, 2002.
37. GARDNER, D.L. Production of arthritis in the rabbit by the local injection of the mucopolysaccharide carrageenin. **Ann Rheum Dis**, London, v.19, n.4, p.369-376, 1960.
38. GRIFFITHS, R.H. Report of the President's Conference on Examination, Diagnosis and Management of Temporomandibular Disorders. **Am J Orthod**, St Louis, v.83, n.6, p.514-517, 1983.
39. HAAS, D. A. *et al.* Development of an orofacial model of acute inflammation in the rat. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.37, n.5, p.417-422, May 1992.
40. HANSON, M.L. Treatment of oral myofunctional disorders: organismic and other approaches. **Int J Oral Myol**, v.5, n.3, p.9-12, July 1979.
41. HATHAWAY, 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 Neurol**, New York, v.356, n.3, p.444-456, June 1995.

42. HENDERSON, B.; PETTIPHER, E.R. The synovial lining cell: biology and pathobiology. **Semin Arthritis Rheum**, v.15, n.1, p.1-32, Aug. 1985. Review.
43. HENRY, J.L. *et al.* Physiological evidence that the “interphase” in the formalin test is due to active inhibition. **Pain**, Amsterdam, v.82, n.1, p.57-63, July 1999.
44. HENSEN, P.M. Mechanisms of mediator release from inflammatory cells. **Mediators of Inflammation**, Plenum, New York (ed. Weissmann G.), 1974.
45. HONG, Y.; ABBOTT, F.V. Behavioural effects of intraplantar injection of inflammatory mediators in the rat. **Neuroscience**, Oxford, v.63, n.3, p.827-836, Dec. 1994.
46. HU, J.M. *et al.* Eletromiographic and trigeminal brainstem neuronal changes associated with inflammatory irritation of superficial and deep craniofacial tissues in rats. *In*: GEBHART, G.F.; HAMMOND, D.L.; IENSEN, T.S. (Ed.) **Proceedings of the 7<sup>th</sup> World Congress on Pain: progress in pain research and management**. Seattle: IASP Press, 1994. v.2
47. HU, J.M. *et al.* Deep craniofacial pain: involvement of trigeminal subnucleus caudalis and its modulation. *In*: JENSEN, T.S.; TURNER, J.A.; WIESENFELD-HALLIN, Z. (Ed.) **Proceedings of the 8<sup>th</sup> World Congress on Pain: progress in pain research and management**. Seattle: IASP Press, 1997. v.8

48. HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, Amsterdam, v.30, n.1, p.103-114, Jul 1987.
49. HUTCHEON, B.; PUIL, E.; SPIGELMAN, I. Histamine actions and comparisons with substance P effects in trigeminal neurons. **Neuroscience**, Oxford, v.55, n.2, p.521-529, July 1993.
50. KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSELL, T.M. **Princípios da Neurociência**. 4 ed. Barueri: Manole, 2003. 1430p.
51. KODA, H. *et al.* H<sub>1</sub> receptor mediated excitation and facilitation of the heat response by histamine in canine visceral polymodal receptors studied in vitro. **J Neurophysiol**, Bethesda, v.76, n.3, p.1396-1404, Sept. 1996.
52. LENT, R. **Cem Bilhões de Neurônios: Conceitos Fundamentais da Neurociência**. São Paulo: Editora Atheneu, 2001. cap.7, p.209-240.
53. LOUIS, S.M. *et al.* Antibodies to calcitonin-gene related peptide reduce inflammation induced by topical mustard oil but not that due to carrageenin in the rat. **Neurosci Lett**, Clare, v.102, n.2-3, p.257-260, July 1989.
54. LUND, J.P. *et al.* **Orofacial Pain**: from basic science to clinical management. 1<sup>st</sup> ed. Carol Stream: Quintessence Books, 2001. 300p.
55. MACHADO, A. **Neuroanatomia Funcional**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1993. 364p.

56. MALMBERG-AIELLO, P. *et al.* Evidence for hypernociception induction following histamine H<sub>1</sub> receptor activation in rodents. **Life Sci**, Oxford, v.63, n.6, p.463-476, July 1998.
57. MALONE, D.G. *et al.* Mast cell numbers and histamine levels in synovial fluids from patients with diverse arthritides. **Arthritis Rheum**, Philadelphia, v.29, n.8, p.956-963, Aug. 1986.
58. McCALL, W.D. *et al.* Formalin induces biphasic activity in C-fibers in the rat. **Neurosci Lett**, Clare, v.208, n.1, p.45-48, Apr. 1996.
59. McNEILL, C. **Temporomandibular disorders**: guidelines for classification, assessment, and management. 2<sup>nd</sup> ed. Carol Stream: Quintessence Publishing, 1993.
60. MERSKY, Y.H. Classification of chronic pain. Descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. Prepared by the International Association for the Study of Pain, Subcommittee on Taxonomy. **Pain Suppl**, Amsterdam, v.3, p.S1-S226, 1986.
61. MILLAN, M.J. The induction of pain: an integrative review. **Prog Neurobiol**, v.57, n.1, p.1-164, Jan. 1999. Review.
62. MOBARAKEH, J.I. *et al.* Role of histamine H<sub>1</sub> receptor in pain perception: a study of the receptor gene knockout mice. **Eur J Pharmacol**, Amsterdam, v.391, n.1-2, p.81-89, Mar. 2000.

63. MORGANROTH, M.L.; YOUNG, E.W.; SPARKS, H.V. Prostaglandin and histaminergic mediation of prolonged vasodilatation after exercise. **Am J Physiol**, Bethesda, v.233, n.1, p.H27-H33, Jul. 1977.
64. NAKAMURA, M.; FERREIRA, S.H. A peripheral sympathetic component in inflammatory hyperalgesia. **Eur J Pharmacol**, Amsterdam, v.135, n.2, p.145-153, Mar. 1987.
65. NAKASAKI, T. *et al.* Effects of PAF on histamine H<sub>1</sub> receptor mRNA expression in rat trigeminal ganglia. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**, New York, v.58, n.1, p.29-41, Aug. 1999.
66. NINKOVIC, M.; HUNT, S.P.; GLEAVE, J.R.W. Localization of opiate and histamine H<sub>1</sub> receptor in the primate sensory ganglia and spinal cord. **Brain Res**, Amsterdam, v.241, n.2, p.197-206, June 1982.
67. NINKOVIC, M.; HUNT, S.P. Opiate and histamine H<sub>1</sub> receptors are present on some substance P-containing dorsal root ganglion cells. **Neurosc Lett**, Clare, v.53, n.1, p.133-137, Jan. 1985.
68. ONODERA, K. *et al.* Neuropharmacology of the histaminergic neuron system in the brain and its relationship with behavioral disorders. **Prog Neurobiol**, v.42, n.6, p.685-702, Apr. 1994. Review.
69. PARADA, C.A.; LUCCARINI, P.; WODA, A. Effect of an NMDA receptor antagonist on the wind-up of neurons in the trigeminal oralis subnucleus. **Brain Res**, Amsterdam, v.761, n.1, p.313-320, July 1997.

70. PARADA, C.A. *et al.* The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced nociception. **Neuroscience**, Oxford, v.102, n.4, p.937-944, 2001.
71. PUIG, S.; SORKIN, L.S. Formalin-evoked activity in identified primary afferent fibers: systemic lidocaine suppresses phase-2 activity. **Pain**, Amsterdam, v.64, n.2, p.345-355, Feb. 1996.
72. REN, K.; DUBNER, R. Central nervous system plasticity and persistent pain. **J Oralfacial Pain**, Carol Stream, v.13, n.3, p.155-163, 1999.
73. RILEY, J.F.; WEST, G.B. The presence of histamine in tissue mast cells. **J Physiol**, New York, v.120, n.4, p.528-537, 1953.
74. ROSENTHAL, S.R.; MINARD, D. Experiments on histamine as the chemical mediator for cutaneous pain. **J Exp Med**, v.70, p.415-425, 1939.
75. ROSENTHAL, S.R. Histamine as the chemical mediator for cutaneous pain. **J Invest Dermatol**, Malden, v.69, n.1, p.98-105, July 1977. Review.
76. 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.
77. ROSLAND, J.H. The formalin test in mice: the influence of ambient temperature. **Pain**, Amsterdam, v.45, n.2, p.211-216, May 1991.

78. ROVERONI, R.C. **Desenvolvimento de um modelo comportamental de dor na ATM de ratos: participação dos receptores H<sub>1</sub>**. Piracicaba, 1999. 89p. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.
79. ROVERONI, R.C. *et al.* Development of a behavioral model of TMJ pain in rats: the TMJ formalin test. **Pain**, Amsterdam, v.94, n.2, p.185-191, Nov. 2001.
80. RUMORE, M.M.; SCHLICHTING, D.A. Analgesic effects of antihistaminics. **Life Sci**, Oxford, v.36, n.5, p.403-416, Feb. 1985. Review.
81. SAWYNOK, J. *et al.* Adenosine A<sub>3</sub> receptor activation produces nociceptive behaviour and edema by release of histamine and 5-Hydroxytryptamine. **Eur J Pharmacol**, Amsterdam, v.333, n.1, p.1-7, Aug. 1997.
82. SCHWARTZ, L.; CHAYES, C.M. Dolor de la articulación temporomandibular. In: SCHWARTZ, L., CHAYES, C.M. (Eds.) **Dolor facial y disfunción mandibular**. Argentina: Editorial Mundi, 1973, p.27-30.
83. SENBA, E.; KASHIBA, H. Sensory afferent processing in multi-responsive DRG neurons. **Prog Brain Res**, v.113, p.387-410, 1996. Review.

84. SESSLE, B.J. Brainstem mechanisms underlying craniofacial pain and its modulation. **Adv Pain Res Ther**, Philadelphia, v.22, p.413-421, 1995.
85. SESSLE, B.J. Mechanism of trigeminal and occipital pain. **Pain Rev**, London, v.3, p.91-116, 1996.
86. SESSLE, B.J. Acute and chronic craniofacial pain: brainstem mechanisms of nociceptive transmission and neuroplasticity, and their clinical correlates. **Crit Rev Oral Biol Med**, Boca Raton, v.11, n.1, p.57-91, 2000. Review.
87. SHIBATA, M. *et al.* Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. **Pain**, Amsterdam, v.38, n.3, p.347-352, Sep. 1989.
88. SIMONE, D.A.; ALREJA, M.; LaMOTTE, R.H. Psychophysical studies of the itch sensation and itch skin ('allokynesis') produced by intracutaneous injection of histamine. **Somatosens Mot Res**, New York, v.8, n.3, p.271-279, 1991.
89. SIQUEIRA, J. T. T.; TEIXEIRA, M. J. **Dor Orofacial: Diagnóstico, Terapêutica e Qualidade de Vida**. Curitiba: Editora Maio, 2001. 673p.
90. SUZUKI, T. *et al.* The differential effects of histamine receptor antagonists on morphine and U-50,488 induced antinociception in the mouse. **Life Sci**, Oxford, v.54, n.3, p.203-211, 1994.

91. 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.1288-1295, Nov. 1998.
92. TAIWO, Y.O.; HELLER, P.H.; LEVINE, J.D. Mediation of serotonin hyperalgesia by the cAMP second messenger system. **Neuroscience**, Oxford, v.48, n.2, p.479-483, May 1992.
93. TAIWO, Y.O.; LEVINE, J.D. Serotonin is a directly-acting hyperalgesic agent in the rat. **Neuroscience**, Oxford, v.48, n.2, p.485-490, May 1992.
94. TANAKA, S.; SOHEN, S.; FUKUDA, K. A role for histamine receptors in rheumatoid arthritis. **Semin Arthritis Rheum**, Philadelphia, v.26, n.6, p.824-833, June 1997. Review.
95. TANI, E. *et al.* Histamine acts directly on calcitonin gene-related peptide and substance P containing trigeminal ganglion neurons as assessed by calcium influx and immunocytochemistry. **Neurosc Lett**, Clare, v.115, n.2-3, p.171-176, July 1990.
96. TAYLOR, B.K.; PETERSON, M.A.; BASBAUM, A.I. Persistent cardiovascular and behavioral nociceptive responses to subcutaneous formalin require peripheral nerve input. **J Neurosc**, Cary, v.15, n.11, p.7575-7584, Nov. 1995.
97. THILANDER, B. Innervation of the temporomandibular joint capsule in man. **Trans Royal School Dent** (Stockholm and Umea), v.7, p.9-67, 1961.

98. TJOLSEN, A. *et al.* The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, Amsterdam, v.51, n.1, p.5-17, Oct. 1992. Review.
99. TONUSSI, C.R.; FERREIRA, S.H. Tumor necrosis factor- $\alpha$  mediates carrageenin-induced knee joint incapacitation and also triggers overt nociception in previously inflamed rat knee-joints. **Pain**, Amsterdam, v.82, n.1, p.81-87, July 1999.
100. 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, p.115-128, May 1999.
101. VINEGAR, R. *et al.* Pathway to carrageenan-induced inflammation in the hind limb of the rat. **Fed Proc**, Bethesda, v.46, n.1, p.118-126, Jan. 1987.
102. WALL, P.D.; MELZACK, R. **Textbook of Pain**. 4<sup>th</sup> ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1999. 1588p.
103. WATANABE, M. *et al.* Possible involvement of histamine in muscular fatigue in temporomandibular disorders: animal and human studies. **J Dent Res**, Alexandria, v.78, n.3, p.769-775, Mar. 1999.
104. WHEELER-ACETO, H.; PORRECA, F.; COWAN, A. The rat paw formalin test: comparison of noxious agents. **Pain**, Amsterdam, v.40, n.2, p.229-238, Feb. 1990.

105. WHEELER-ACETO, H.; COWAN, A. Naloxone causes apparent antinociception and pronociception simultaneously in the rat paw formalin test. **Eur J Pharmacol**, Amsterdam, v.236, n.2, p.193-199, May 1993.
106. WOOLF, C.J. Windup and central sensitization are not equivalent. **Pain**, Amsterdam, v.66, n.2-3, p.105-108, Aug. 1996. Review.
107. 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 brainstem nociceptive neurons. **J Neurophysiol**, Bethesda, v.70, n.4, p.1704-1707, Oct. 1993.
108. ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigation of experimental pain in conscious animals. **Pain**, Amsterdam, v.16, n.2, p.109-110, June 1983.

## ANEXO 1



Universidade Estadual de Campinas  
Instituto de Biologia



CEEA-IB-UNICAMP

Comissão de Ética na Experimentação Animal  
CEEA-IB-UNICAMP

## CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 343-1, sobre "PARTICIPAÇÃO  
DOS RECEPTORES HISTAMINÉRGICOS E SEROTONINÉRGICOS  
PERIFÉRICOS NA DOR DA ATM"

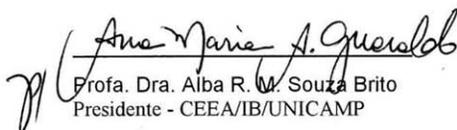
sob a responsabilidade de Profa. Dra. CLAUDIA FERRERA TAMBELI  
está  
de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo  
Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela  
Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de  
03.5.1.2002

## CERTIFICATE

We certify that the protocol nº ....., entitled "....."  
.....  
.....

is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the  
Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by  
the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of  
Campinas - UNICAMP) on ...../...../.....  
(d) (m) (y)

Campinas, 03 de Maio de 2002

  
Profa. Dra. Alba R. W. Souza Brito  
Presidente - CEEA/IB/UNICAMP

  
Prof. Dr. Armando Ferreira Lima  
Secretário - CEEA/IB/UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
CIDADE UNIVERSITÁRIA ZEFERINO VAZ  
CEP -13.081-970 - CAMPINAS - SP - BRASIL

TELEFONE 55 19 37887116  
FAX 55 19 32893124

**ANEXO 2**

Ficha utilizada para quantificar as respostas comportamentais induzidas pela administração de drogas na região da ATM de ratos, durante o período de observação de 30 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
CO										
LC										

CO: comportamento de coçar a região orofacial (segundos)

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

**APÊNDICE**

**TABELA 1a**

Animal	Salina 0,9%	Histamina 100µg	Histamina 250µg	Histamina 500µg
1	60,78	38,88	67,27	124,71
2	22,00	34,14	100,68	85,63
3	39,98	28,43	84,28	94,48
4	51,25	51,62	77,09	48,77
5	27,03	55,79	52,74	36,46
6	51,25	63,65	100,97	9,00
7	12,00		103,81	40,53
8	29,39			47,91
9	43,10			57,22
10	105,53			76,58
11	10,51			
12	34,82			
13	26,35			
14	27,40			
Média ± E.P.M.	38,67 ± 6,22	45,42 ± 5,10	83,83 ± 6,80	62,13 ± 10,04

**TABELA 1b**

Animal	Histamina 250µg	Histamina 250µg + Pirilamina 400µg	Histamina 250µg + QX-314, 4%
1	67,27	74,78	40,33
2	100,68	26,25	32,80
3	84,28	113,89	8,00
4	77,09	38,00	29,89
5	52,74	44,21	28,16
6	100,97	62,38	36,39
7	103,81	24,45	68,58
8		39,99	31,37
9		20,19	
10		22,07	
Média ± E.P.M.	83,83 ± 6,80	46,62 ± 8,89	34,44 ± 5,56

**TABELA 2a**

Animal	Salina 0,9%	Serotonina 100µg	Serotonina 250µg	Serotonina 500µg	Serotonina 500µg + QX-314, 4%
1	60,78	73,30	140,75	131,83	64,76
2	22,00	40,74	58,00	68,00	93,42
3	39,98	121,07	112,04	111,04	50,28
4	51,25	12,00	115,97	67,23	45,93
5	27,03	42,93	191,42	275,08	30,08
6	51,25	25,98	116,42	95,46	43,18
7	12,00	4,00		91,92	41,32
8	29,39	130,15			
9	43,10	81,47			
10	105,53	44,80			
11	10,51				
12	34,82				
13	26,35				
14	27,40				
Média ± E.P.M.	38,67 ± 6,22	57,64 ± 12,93	122,43 ± 16,19	120,08 ± 25,21	52,71 ± 7,27

**TABELA 2b**

Animal	Histamina 100µg	Serotonina 100µg	Histamina 100µg + Serotonina 100µg
1	38,88	73,30	127,65
2	34,14	40,74	53,30
3	28,43	121,07	186,37
4	51,62	12,00	67,55
5	55,79	42,93	123,85
6	63,65	25,98	181,28
7		4,00	126,64
8		130,15	33,69
9		81,47	151,56
10		44,80	53,28
Média ± E.P.M.	45,42 ± 5,10	57,64 ± 12,93	110,52 ± 16,58

**TABELA 3a**

Animal	Salina + Salina 1hora após	Carragenina 100µg + Salina 1hora após	Carragenina 100µg + Serotonina 100µg 1hora após	Salina + Serotonina 100µg 1hora após
1	27,97	28,97	159,85	39,66
2	62,50	36,41	123,16	27,34
3	12,28	13,00	129,90	52,16
4	19,62	13,00	116,01	51,60
5	7,93	51,41	199,60	40,56
6	31,47	32,94	118,63	6,29
7		65,55	143,40	
8		15,15	141,98	
9		3,00		
Média ± E.P.M.	26,96 ± 7,30	28,83 ± 6,37	141,57 ± 9,15	36,27 ± 6,45

**TABELA 3b**

Animal	Carragenina 100µg + Salina 1hora após	Histamina 100µg + Salina 1hora após	Carragenina 100µg + Histamina 100µg 1hora após
1	28,97	38,24	33,62
2	36,41	8,13	25,87
3	13,00	10,44	34,93
4	13,00	35,62	65,39
5	51,41	31,43	26,94
6	32,94	5,00	3,00
7	65,55		32,71
8	15,15		36,17
9	3,00		
Média ± E.P.M.	28,83 ± 6,37	45,42 ± 5,10	32,33 ± 5,66