

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

Ana Paula Varela Brown Martins

**SUPRESSÃO DE ESTÍMULO NOCICEPTIVO NA ARTICULAÇÃO
TEMPOROMANDIBULAR DE RATOS FÊMEAS USANDO PIPERINA**

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Clínica Odontologia, na área de Prótese Dentária.

Orientadora: Profa. Dra. Célia Marisa Rizzatti Barbosa

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida pela aluna Ana Paula Varela Brown Martins e orientada pela Profa. Dra. Célia Marisa Rizzatti Barbosa.

Assinatura do Orientador

Piracicaba, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARILENE GIRELLO – CRB8/6159 - BIBLIOTECA DA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP

M366s Martins, Ana Paula Varela Brown, 1979-
Supressão de estímulo nociceptivo na articulação
temporomandibular de ratos fêmeas usando piperina / Ana Paula
Varela Brown Martins. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Célia Marisa Rizzatti-Barbosa
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Comportamento animal. 2. Pimenta-do-reino. I. Rizzatti-
Barbosa, Célia Marisa. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para a Biblioteca Digital

Título em Inglês: Experimental model for suppression of nociceptive stimuli in
the TMJ of rats with piperine

Palavras-chave em Inglês:

Behavior, animal

Piper nigrum

Área de concentração: Prótese Dental

Titulação: Mestre em Clínica Odontológica

Banca examinadora:

Célia Marisa Rizzatti-Barbosa [Orientador]

Jarbas Francisco Fernandes dos Santos

Altair Antoninha Del Bel Cury

Data da defesa: 09-09-2011

Programa de Pós-Graduação: Clínica Odontológica



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 09 de Setembro de 2011, considerou a candidata ANA PAULA VARELA BROWN MARTINS aprovada.



Profa. Dra. CELIA MARISA RIZZATTI BARBOSA



Prof. Dr. JARBAS FRANCISCO FERNANDES DOS SANTOS



Profa. Dra. ALTAIR ANTONINHA DEL BEL CURY

Dedico este trabalho a minha FAMÍLIA pelo incentivo para meu crescimento profissional, estímulo nos momentos certos e compreensão da minha ausência durante este período.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pelas oportunidades dadas, pela proteção e orientação, especialmente nesses anos longe de casa para obtenção desta conquista.

À **Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas (FOP/Unicamp)**, na pessoa de seu diretor Prof. Dr. Jacks Jorge Junior, pela utilização de suas instalações.

À **Profa. Dra. Renata Cunha Matheus Rodrigues Garcia**, Coordenadora Geral dos cursos de pós-graduação da FOP/Unicamp.

Ao **Prof. Dr. Márcio de Moraes**, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica.

À minha **FAMÍLIA**: minha mãe, Miriam Martins; meu pai, Paulo Martins; meus irmãos, Paulo Neto e Ana Carina Maia; cunhado: Alexandre Maiae sobrinhos muito queridos: Rafael Maia, Felipe Maia; Eunice Lopes e Emília Araújo; avós, Dalva Passos e José Moacyr Passos; pelo apoio e estímulo; amor e carinho incondicionais e por acreditarem no meu crescimento profissional.

À minha orientadora, **Profa. Dra. Célia Marisa Rizzatti Barbosa**, pelas orientações, paciência, confiança e compreensão, exemplo de profissionalismo e entusiasmo pela profissão.

Aos meus queridos amigos: **Luciana Valadares, Andréa Lira, Iza Peixoto**, pelos primeiros incentivos a vir para Piracicaba; **Fabiana Praia, Ediane Lustosa, Ana Verena Gonçalves, Blandina Brandão, José Maurício Brandão, Livia Carvalho**, por torcerem pelo meu crescimento e a todos os meus colegas e amigos da graduação. Aos meus amigos baianos, residentes em Piracicaba: **Luana Bastos, Livia Aguilera, Frederico Sampaio e**

Manoela Carrera. Às minha amigas do quarteto fantástico: **Luana de Aquino, Milene de Oliveira e Celina de Abreu** pelos momentos de descontração, de superação, ensinamentos e por todo o suporte. **Janice Simpson, Máira Silva e Brunna Moreira** pelos momentos compartilhados e a todos meus amigos de laboratório, em especial: **Carol Meloto, William Custódio, Alfonso Sanches** pelo apoio, desabafos e ensinamentos.

Aos meus eternos mestre: **Luciano Castellucci, Vagner Mendes, Armando Prado, Guilherme Meyer, Analu Andrade, Vera Rocha,** por despertarem em mim o amor pela prótese.

Aos funcionários do Biotério, **Daniely Libório Machado, Wanderley Vieira, Fábio Padilha e D. Floriza Aparecida Godoy,** pelo suporte oferecido durante o trabalho com os animais. A **Eliete Marim,** secretária da Prótese Dental, pela disponibilidade em ajudar. A **Gislaine Piton,** técnica do laboratório de PPR, pelo apoio incondicional, incentivo e acolhimento.

Aos **Professores do Departamento de Prótese Dental,** em especial aos **Professores de Prótese Parcial Removível, Profa. Altair Cury, Profa. Renata Cunha, Prof. Wander Silva** por todo ensinamento.

Aos amigos da Fisiologia, **Karla Chavés, Luís Prevedello, Marília Bertodto e Nádia Fávaro,** pelo ensinamento e ajuda.

Às amigas, **Noélia Sacramento, Maria José Almeida, Railda Silva, Raimunda Plazo,** que mesmo de longe torcem pelo meu crescimento profissional.

Vencerás

“Não desanimes.

Persiste mais um tanto.

Não cultives pessimismo.

Centraliza-te no bem a fazer.

Esquece as sugestões do medo destrutivo.

Segue adiante, mesmo varando a sombra dos próprios erros.

Avança ainda que seja por entre lágrimas.

Trabalha constantemente.

Edifica sempre.

Não consintas que o gelo do desencanto te entorpeça o coração.

Não te impressiones nas dificuldades.

Convence-te de que a vitória espiritual é construção para o dia-a-dia.

Não desistas da paciência.

Não creias em realizações sem esforço...”

Emmanuel por Chico Xavier

RESUMO

As articulações temporomandibulares (ATM) podem ser afetadas por alterações articulares e/ou musculares que podem progredir e iniciar mudanças degenerativas, culminando em osteoartrite (OA). A liberação de mediadores químicos, durante processo inflamatório na ATM, pode modular a condução dos estímulos nociceptivos e promover a expansão e agravamento do campo neuroinflamatório na sensibilização central. Portanto, para melhor compreender e investigar o processo inflamatório e suas vias de condução da dor na disfunção temporomandibular (DTM), este estudo teve como objetivo desenvolver um modelo experimental para supressão da condução de estímulo nociceptivo gerado na região da ATM de ratos fêmeas *Wistar* usando piperina (*Piper nigrum*), bem como determinar a concentração necessária de piperina para produzir tal efeito. Para isso, foram utilizados 20 ratos fêmeas, divididos em 4 grupos (n=5), que tiveram injetadas na sua ATM direita 25µl de uma das seguintes soluções: salina fisiológica, 4, 6 ou 8µg de piperina diluídas, individualmente, em 100ml de solução de 10% de álcool etílico, 10% de Tween 80 e 80% de solução fisiológica estéril. Após 8 a 12 dias, todas as ratas, na fase estro do ciclo hormonal receberam, na mesma ATM, a aplicação de 25µl de nova solução de 2µg piperina, que agiu como agente irritante, diluída como previamente citado, e foram imediatamente avaliadas quanto aos comportamentos nociceptivos de coçar a região orofacial com uma das patas e/ou de deslocar repetida e descoordenadamente a cabeça. Estes dados foram quantificados sob a forma de tempo gasto pelo animal coçando a região orofacial, de número de vezes em que deslocou a cabeça, e da soma destes comportamentos, considerando que o comportamento de deslocamento da cabeça seguiu um padrão uniforme de 1 segundo de duração, cada deslocamento foi expresso com 1 segundo. Os dados coletados foram submetidos à análise de variância (ANOVA, um critério) e teste de Bonferroni (post-hoc, $\alpha=0.05$). Para os animais que receberam injeção prévia de solução fisiológica estéril, 4, 6 ou 8µg/100ml de piperina, a média (\pm desvio padrão) do tempo gasto (em segundos) coçando a cabeça foi de 54.2 (± 7.29), 63.4 (± 12.82), 55.4 (± 9.95), e 30.8 (± 4.2), respectivamente; a média do número de vezes em que houve deslocamento da cabeça foi de 39 (± 7.17), 47.6 (± 4.91), 38.8 (± 3.76), e 25.6 (± 2.8),

respectivamente; por fim, a média da soma dos comportamentos foi de 93.2 (\pm 8.45), 111 (\pm 10.79), 94.2 (\pm 9.4), e 56.4 (\pm 4.18), respectivamente. A injeção prévia de 8×10^{-3} μ g/ml de piperina da ATM provou reduzir, significativamente, os comportamentos nociceptivos avaliados, quando associados, em comparação ao grupo injetado com solução fisiológica estéril. Portanto, a injeção de solução de piperina na concentração 8×10^{-3} μ g/ml na ATM de ratos mostrou-se eficaz na redução da condução de estímulos nociceptivos em comparação à solução salina fisiológica.

Palavras-chave: Comportamento Animal – Articulação Temporomandibular – *Piper nigrum*

ABSTRACT

Temporomandibular joints (TMJ) may be affected by articular and/or muscle alterations that can progress and initiate degenerative changes, culminating in osteoarthritis (OA). The release of chemical mediators, during inflammation in the TMJ, can modulate the conduction of nociceptive stimuli and promote the expansion and aggravation of the neuroinflammatory field in central sensitization, which in turn, seems to contribute to the impairment of sites other than the origin of the inflammatory process. So, to better understand and investigate the inflammatory process and its pain pathways in temporomandibular disorders (TMD), this study aimed to develop a model for suppression of the nociceptive stimulus generated in the TMJ region of *Wistar* rats using piperine (*Piper nigrum*), and to determine the necessary concentration of piperine to produce such effect. For that, 20 female rats were divided into 4 groups (n=5), and they had their right TMJ injected with 25µl of one of the following solutions: saline, 4, 6 or 08µg/100ml of piperine. After 8 to 12 days, rats in the estrous phase of the hormonal cycle had the same TMJ injected with a new piperine solution (25µl, 2µg/100ml) which acted as irritant, and were immediately evaluated for the nociceptive behaviors of rubbing the orofacial region with one the paws and/or of flinching the head repetitively and uncoordinatedly and the sum of this behaviors, considering that the flinching of the head behavior followed a uniform pattern of 1 second in duration, each flinching was expresses as 1 second. These data were quantified in terms of time spent rubbing the orofacial region, of number of times of head flinches, and of the sum of both behaviors. Data collected were submitted to analysis of variance (ANOVA, one-way) and Bonferroni's test (*post-hoc*, $\alpha=0.05$). For the animals that received previous injection of saline, 4, 6 or 8µg/100ml of piperine solutions, the means (\pm standard deviations) for time (in seconds) spent rubbing the orofacial region were 54.2 (± 7.29), 63.4 (± 12.82), 55.4 (± 9.95), e 30.8 (± 4.2), respectively; for the number of head flinches, the means were 39 (± 7.17), 47.6 (± 4.91), 38.8 (± 3.76), e 25.6 (± 2.8), respectively; finally, the means for the sum of both behavior were 93.2 (± 8.45), 111 (± 10.79), 94.2 (± 9.4), e 56.4 (± 4.18), respectively. Previous injection of the TMJ with 8×10^{-3} µg/ml of piperine solution has proved to reduce the sum of the nociceptive behaviors, compared to

injection of saline solution. Therefore, the injection of piperine solution at concentration of $8 \times 10^{-3} \mu\text{g/ml}$ in the TMJ of rats has shown to be effective in the reduction of the conduction of nociceptive stimuli compared to saline solution.

Key words: Nociceptive Behavior – Temporomandibular Joint – *Piper nigrum*

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ATM – Articulação temporomandibular

CGRP – Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

IL - Interleucina

OA – Osteoartrite

PG - Prostaglandina

SN – Sistema nervoso

SNC – Sistema nervoso central

SP – Substância P

TNF – Fator de necrose tumoral

TRPV1 – Receptor transiente de potencial de canal

SUMÁRIO

Introdução	1
Capítulo <i>Experimental model for suppression of nociceptive stimuli in the TMJ of female rats with piperine</i>	7
Conclusão	23
Referências	24
Anexo I	29
Anexo II	30
Anexo III	31

A dor temporomandibular ainda é pouco compreendida, apesar de clinicamente importante, em função da elevada prevalência em países como os Estados Unidos da América (Lipton *et al.*, 1993; LeResche & Drangsholt, 2008), como no Brasil (Gonçalves *et al.*, 2010) e ainda é pouco compreendida. Isto pode ser explicado, pelo menos em parte, pelo número limitado de modelos experimentais que estudem os mecanismos fisiológicos nesta condição. Desta forma, o desenvolvimento de modelos experimentais que possibilite estas investigações pode representar relevância clínica na medida em favorecerão a compreensão destes fenômenos (Roveroni *et al.*, 2001).

A prevalência, duração e severidade da dor na disfunção temporomandibular (DTM) são maiores em mulheres (Flake *et al.*, 2006; LeResche & Drangsholt, 2008) e sugerem que o estrógeno influencia a patofisiologia da dor na DTM (Flake *et al.*, 2006), de modo que a mesma acomete mais mulheres durante a fase reprodutiva (Carlsson, 1999), ou usuárias de estrogênio exógeno (LeResche *et al.*, 1997). Uma possível explicação é que este hormônio parece contribuir para dor na DTM modulando o processo inflamatório associado com o dano local da articulação temporomandibular (ATM), ou aumentando a excitabilidade das terminações na articulação ou regulando a expressão e liberação de neuropeptídeos inflamatórios (Flake *et al.*, 2006).

Modelos experimentais de indução de dor e/ou inflamação foram desenvolvidos e validados. Por meio deste, pôde-se estudar os mecanismos envolvidos nas condições de dor craniofacial superficial e profunda, mudanças nos sistemas nervosos central e periférico, envolvimento dos diversos mediadores inflamatórios (Bonjardim *et al.*, 2009; Gameiro *et al.*, 2005; Roveroni *et al.*, 2001; Fiorentino *et al.*, 1999). Entretanto, esses modelos não foram desenvolvidos em fêmeas nem possibilitaram a avaliaram a supressão das fibras aferentes que poderiam participar na exacerbação e manutenção do processo inflamatório por meio da participação do sistema nervoso central (SNC).

A ATM recebe inervação sensorial do ramo mandibular do nervo trigêmeo (Sessle *et al.*, 2008). Os corpos celulares dos neurônios sensoriais primários deste nervo

estão localizados na porção póstero-lateral do gânglio trigeminal, e projetam periféricamente fibras amielínicas (fibras C) ou finamente mielinizadas (fibras A δ) para as estruturas da face e mandíbula (Kyrkanides *et al.*, 2007). A sensibilização dos núcleos sensoriais trigeminais no tronco cerebral, que pode vir em decorrência de um processo inflamatório, está envolvida no processamento central da nocicepção advinda da ATM (Sessle *et al.*, 2008). Tanto é que injúrias álgicas provocadas na ATM resultam em aumento dos níveis de expressão de neuropeptídeos envolvidos na dor, tais como a Substância P (SP) (Kyrkanides *et al.*, 2002) e Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina (CGRP) (Lai *et al.*, 2006), em fibras nervosas sensoriais primárias no nível do subnúcleo caudal, e do núcleo sensitivo principal do trigêmeo (Kyrkanides *et al.*, 2007).

A dor temporomandibular passa pela sensibilização periférica de nervos sensoriais primários, podendo provocar uma neuroinflamação que leva à ativação de células da glia (astrócitos e micróglia), bem como à expressão de mediadores da inflamação, como a IL-1 β (Guo *et al.*, 2007; Fiorentino *et al.*, 2008). Embora esta sensibilização possa ser localizada inicialmente, ao longo do tempo o campo neuroinflamatório pode expandir e incluir um número cada vez maior de células adjacentes (Fiorentino *et al.*, 2008). A expansão deste campo pode causar a sensibilização central de neurônios sensoriais primários, que por sua vez, podem contribuir para o desenvolvimento e manutenção da artrite via a liberação antidrômica de fatores inflamatórios na articulação (Fiorentino *et al.*, 2008). É possível, então, especular sobre um possível papel do sistema nervoso sensorial no desenvolvimento de condições artríticas.

A este respeito, estudos já demonstraram que a presença de IL-1 β no corno dorsal da medula de ratos foi suficiente para o desenvolvimento de artrite na ATM (Fiorentino *et al.*, 2008), e que a indução da expressão de receptores μ -opióides humanos (HuMOR) na ATM de ratos não só preveniu o desenvolvimento de dor orofacial, como atenuou o grau de alterações histopatológicas na articulação, o que foi mediado pela expressão de HuMOR nos corpos celulares neuronais localizado no gânglio trigeminal, assim como em seus ramos nervosos proximal e distal, localizados nos núcleos sensorial principal e subnúcleo caudal do tronco cerebral e nas articulações, respectivamente (Kyrkanides *et al.*, 2007). Mediante estes fatos, parece claro que o sistema nervoso

sensorial está de alguma forma, envolvido no acometimento da ATM por processos inflamatórios. Especula-se se a combinação entre sensibilização central e expansão do campo neuroinflamatório e liberação antidrômica de fatores inflamatórios pode estar implicada no acometimento de uma ATM saudável e contralateral àquela afetada por um processo inflamatório, como a osteoartrite (OA).

Na ATM, a OA é caracterizada por ser uma condição crônica que resulta na deterioração e abrasão das superfícies da cartilagem articular e dos tecidos moles, remodelamento e espessamento do osso subjacente, e formação de osteófitos e cistos subarticulares (Takahashi *et al.*, 1998; Zarb & Carlsson, 1999; Bonnet & Walsh, 2005; Grandmont, 2007). Na maioria dos casos, ocorrem unilateralmente e os sintomas parecem piorar com os dias (Zarb & Carlsson, 1999; Grandmont, 2007). Quando bilateral, um lado comumente mostra maior severidade (Grandmont, 2007).

As citocinas pró-inflamatórias, dentre elas a IL-1 β e o TNF- α , estão envolvidas na patogênese da OA (Kubota *et al.*, 1997; Takahashi *et al.*, 1998; Curtis *et al.*, 2002; Goldring & Goldring, 2004;) e na dor articular (Shafer *et al.*, 1994; Takahashi *et al.*, 1998). Ambas têm papel chave na amplificação e perpetuação da inflamação (Curtis *et al.*, 2002; Lobbezoo *et al.*, 2004). A IL-1 β parece ser um dos determinantes de dor, alodínia e hiperalgesia da ATM (Lobbezoo *et al.*, 2004) pela existência de uma relação entre dor na área articular e a detecção de IL-1 β (Takahashi *et al.*, 1998; Suzuki *et al.*, 1999). O TNF também pode estar associado à produção de dor através de seus efeitos na síntese de prostaglandina (Shafer *et al.*, 1994).

Na inflamação, essas substâncias químicas agem nos receptores de dor (Nishimura *et al.*, 2002) provocando mudanças marcantes nas conexões centrais dos nervos sensitivos e na síntese e liberação de neurotransmissores e neuromoduladores (Niissalo *et al.*, 2002), desenvolvendo a sintomatologia dolorosa (Nishimura *et al.*, 2002). Neuropeptídeos como SP, que consiste em um dos principais neurotransmissores de estímulo doloroso (Nishimura *et al.*, 2002) conduzido por fibras C não-mielinizadas (Appelgren *et al.*, 1998), são liberados e agem nos nociceptores aferentes primários podendo causar dor lenta e ardente, como descrito por muitos pacientes com OA (Bonnet & Walsh, 2005). A presença da SP no fluido articular provoca aumento na temperatura

intrarticular, no limiar e na tolerância à dor, além do envolvimento na resposta nociceptiva da articulação artrítica e na modulação da dor artrítica e hiperalgesia (Appelgren *et al.*, 1998).

Com todo o exposto até aqui, parece haver uma intrincada relação entre inflamação na ATM, liberação de mediadores inflamatórios, sensibilização neuronal local e central e, provavelmente, manutenção e exacerbação da condição inflamatória via sistema nervoso sensorial.

A fim de investigar esta relação, em meio a protocolos já bem estabelecidos que promovem a inflamação e hiperalgesia na ATM de ratos (Roveroni *et al.*, 2001), esbarramos na carência de um modelo experimental que permita a supressão de estímulos nociceptivos partindo de uma articulação inflamada em direção ao sistema nervoso central. Ao estabelecer tal protocolo, torna-se possível investigar os efeitos da inflamação local na sensibilização central e expansão do campo neuroinflamatório, bem como os possíveis efeitos da liberação antidrômica de fatores inflamatórios no acometimento de uma ATM saudável e contralateral àquela afetada por um processo inflamatório.

Com isto em mente, experimentos em animais empregando pungentes naturais são desenvolvidos para estudar comportamento nociceptivo, devido ao seu poderoso estímulo nocivo em neurônios sensoriais primários (Geppetti & Trevisan, 2004). A piperina (1-piperoilpiperidina) é um alcalóide que consiste no principal princípio ativo da pimenta do reino (*Piper nigrum*), e que promove uma sensação de ardência supostamente mediada pela ativação do receptor de potencial transiente vanilóide, membro da subfamília vanilóide 1 (TRPV1), o qual foi, inicialmente, descrito como um receptor para capsaicina (Fu *et al.*, 2010). Além da diferença estrutural pela substituição do grupo vanilil pelo metilenodioxi (McNamara, *et al.*, 2005; Szallasi, 2005), a piperina é mais eficiente em induzir dessensibilização do receptor (McNamara, *et al.*, 2005).

Tal suposição se deve ao fato de que estudos iniciais demonstraram que a piperina compartilha sítios de ligação em comum a outros produtos naturais de plantas, como a própria capsaicina e a resiniferatoxina (Liu & Simon, 1996; Szallasi & Blumberg, 1999). Estudos subsequentes conseguiram definir um sítio de ligação em comum entre piperina e capsaicina e demonstraram a habilidade da piperina em ativar correntes em

neurônios sensoriais de ratos, isolados do gânglio trigeminal (Liu & Simon, 1996; Szallasi & Appendino, 2004). Mais recentemente, outro estudo mostrou que as ações da piperina sobre o TRPV1 são coerentes com as ações de um agonista para este receptor, mas também que ela exibe uma clara propensão para induzir dessensibilização do receptor (McNamara *et al.*, 2005).

Acredita-se que o TRPV1 funcione como um integrador molecular de estímulos nocivos, incluindo calor, ácidos, poluentes com mudança elétrica negativa, e substâncias endógenas pró-inflamatórias (Szallasi & Blumberg, 1999). Expresso em tecidos neuronais, tais como medula espinhal (primariamente em fibras eferentes sensoriais) hipotálamo, hipocampo e substância negra, e não-neuronais, tais como mastócitos e glia, sua ativação resulta em rápido aumento dos níveis de Ca^{2+} intracelular (Cortright & Szallasi, 2004). O TRPV1 também é altamente expresso em neurônios primários sensoriais, fibras A- δ e C, nociceptores polimodais que respondem a diversos estímulos como químicos, mecânicos e térmicos (Geppetti & Trevisan, 2004). Linfócitos e mastócitos expressam o TRPV1, evidenciando uma interação entre os sistemas nervoso e imune (Szallasi, 2005).

Mecanismos, ainda pouco esclarecidos, mantêm o TRPV1 no estado inativo (Szallasi, 2005). Possivelmente, o TRPV1 esteja sob o controle inibitório do fosfatidilinosito (4,5)-bisfosfato [Ptd Ins (4,5) P_2], que na presença de agonistas, fosfolipase C (que cliva o Ptd Ins (4,5) P_2) ou proteínas cinases (especialmente a cinase C) podem ativar esse receptor e acoplá-la a outros receptores da dor, como o receptor da bradicinina B_2 (DiMarzo, 2002). O evento iônico desencadeado pela ativação do TRPV1 resulta em um efeito excitatório dos terminais de neurônios sensoriais primários com a subsequente despolarização da fibra nervosa e o início da propagação do potencial de ação (Geppetti & Trevisan, 2004). Influxo de Ca^{2+} em terminações nervosas, impulsionada tanto pela condução antidrômica do potencial de ação ou diretamente pela propagação do TRPV1, provoca a liberação de neuropeptídeos, incluindo CGRP e as taquicininas, SP e neurocinina A (NKA) (Geppetti & Trevisan, 2004). A liberação de SP e de CGRP pode contribuir para o componente neurogênico da inflamação, por terem propriedades pró-inflamatórias (Khan *et al.*, 2008). Esses mediadores podem provocar vasodilatação, extravasamento plasmático, liberação de histamina, PGE2, citocinas (IL-1, IL-6, TNF- α)

contribuindo para a dor e inflamação neurogênica (Khan *et al.*, 2008). Foi comprovada a participação do TRPV1 no desenvolvimento de hiperalgesia pós-inflamatória, pois a expressão desse receptor encontrar-se aumentada em várias desordens humanas como doenças inflamatórias intestinais e trato urinário e condições de dor crônica (Szallasi & Appendino, 2004).

Assim sendo, agentes como a piperina têm o potencial de oferecer benefício terapêutico pela dessensibilização direta do receptor TRPV1 e/ou por uma ‘desfuncionalização’ (McNamara *et al.*, 2005; Boudaka *et al.*, 2007) muito menos seletiva de neurônios sensoriais que carregam este receptor.

Diante dos fatos expostos, parece-nos imprescindível e interessante desenvolver um modelo experimental para supressão de estímulos nociceptivos gerados na região da ATM de ratos *Wistar* fêmeas utilizando piperina, e determinar a concentração mínima de piperina para produzir tal efeito.

Experimental model for suppression of nociceptive stimuli in the TMJ of female rats with piperine

Ana Paula Varela Brown Martins^a

Arcelino Farias Neto^a

Carolina Beralto Meloto^a

Luis Ricardo Prevedello^b

Cláudia Herrera Tambeli^c

Célia Marisa Rizzatti-Barbosa^d

^a Graduate student, Department of Prosthodontics and Periodontology, Piracicaba Dental School, State University of Campinas, São Paulo, Brazil.

^b Specialist in Orofacial Pain and Temporomandibular Disorders, Tuiuti University of Paraná, Paraná, Brazil.

^c Professor, Department of Physiological Sciences, Laboratory of Orofacial Pain, Piracicaba Dental School, State University of Campinas, Piracicaba, São Paulo, Brazil.

^d Professor, Department of Prosthodontics and Periodontology, Piracicaba Dental School, State University of Campinas, Piracicaba, São Paulo, Brazil.

Number of text pages: 17

Number of figures: 04

Corresponding author:

Célia Marisa Rizzatti-Barbosa

Department of Prosthodontics and Periodontology

Piracicaba Dental School, State University of Campinas

Av. Limeira 901, Piracicaba, São Paulo, Brazil – CEP: 13414-903

Phone Number: + 55 19 2106-5373

(e-mail: rizzatti@fop.unicamp.br)

Abstract: We aimed to develop a model for nociceptive stimulus suppression in the TMJ region of female *Wistar* rats using piperine. Twenty female rats were divided into 4 groups ($n=5$), that received an injection in right TMJ of 25 μ l right TMJ of one of the following solutions: sterile saline (control) or piperine (4, 6 and 8 x 10⁻² μ g/ml). After 8 to 12 days of this procedure, the rats in the estrous phase had the same TMJ injected with a new piperine solution (25 μ l; 2 x 10⁻² μ g/ml), and were immediately evaluated for the nociceptive behaviors. The nociception was quantified through the sum of orofacial rubbing time and, the number of head flinches during 45 minutes. The data were submitted to the ANOVA one-way test and Bonferroni's test (*post-hoc*, $\alpha=0.05$). For the sterile saline (control), and the 0,04; 0,06 or 0,08 μ g/ml of piperine injected animals, the means (\pm SD) for time (seconds) of rubbing were 54.2 (\pm 7.29), 63.4 (\pm 12.82), 55.4 (\pm 9.95), and 30.8 (\pm 4.2), respectively; for head flinches, the means were 39 (\pm 7.17), 47.6 (\pm 4.91), 38.8 (\pm 3.76), and 25.6 (\pm 2.8), respectively; finally, the means for the sum of both behavior were 93.2 (\pm 8.45), 111 (\pm 10.79), 94.2 (\pm 9.4), and 56.4 (\pm 4.18), respectively. Previous 8 x 10⁻² μ g/ml TMJ piperine injection has proved to reduce nociceptive behaviors in rats.

Key words: Nociceptive Behavior – Temporomandibular Joint – *Piper nigrum*

1. Introduction

Temporomandibular joint (TMJ) pain and arthritis have been associated with peripheral sensitization of primary sensory afferents and inflammation at the dorsal horns (Lai et al, 2006). Indeed, the expression of human μ -opioid receptors in primary sensory neurons along the central and peripheral trigeminal sensory nerve projections and in the neuronal cell bodies located in the trigeminal sensory ganglion resulted in prevention of orofacial nociceptive behavior and in decreased severity of histopathologic abnormality in the joint in rats (Kyrkanides et al, 2007).

Persistent states of pain and inflammation can activate glia cells to release mediators of inflammation, such as interleukin (IL)-1 β and tumor necrosis factor (TNF)- α in osteoarthritis (OA), which are known to be released by neurons (Yang et al, 2004). Over time, these cytokines evokes the sensitization of afferent nerves that can expand the neuroinflammatory field to include an increasing number of adjacent cell populations and cause central sensitization of primary sensory nerves, contributing to the development and

maintenance of arthritis via the antidromic release of inflammatory mediators (Fiorentino et al, 2008).

Arthritis affects the TMJ unilaterally (Grandmont, 2007, Zarb & Carlsson, 1999), and when it is bilateral, morphological alterations are more severe in one of the joints (Grandmont, 2007). It is considered a progressive pathology (Zarb & Carlsson, 1999) and its symptoms seem to worsen with time (Grandmont, 2007, Zarb & Carlsson, 1999).

Experimental models of TMJ pain and inflammation are long available and validated in the pertinent literature (Lai et al, 2006, Noguchi et al, 2005, Roveroni et al, 2001), however, there is a lack of experimental models capable of suppressing the conduction of nociceptive stimuli from the TMJ region to investigate the involvement of the sensory nervous system in the development and maintenance of arthritis.

Piperine (1-piperoylpiperidine), the primary pungent alkaloid derived from *Piper nigrum* (McNamara et al, 2005), shares a common site of action with capsaicin (Green, 1996) and has the ability to activate whole-cell currents in rat sensory neurons isolated from trigeminal ganglia (Liu & Simon, 1996), which is thought to occur via the transient receptor potential vanilloid (TRPV)-1 (Szallasi & Blumberg, 1991).

TRPV1, a calcium-permeable nonselective cation channel, is activated by inflammatory mediators, protons and noxious heat (Szallasi & Blumberg, 1999). It is an important integrator of a multitude of noxious chemical and physical stimuli, and it is expressed in neurons of the trigeminal ganglion and dorsal root ganglion, mostly associated with unmyelinated fibers (C) and less with small myelinated fibers (A δ) (Geppetti & Trevisani, 2004).

Piperine has been proved to be a potent and effective agonist of the human TRPV1 receptor, with a clear propensity to induce receptor desensitization (McNamara et al, 2005). This pungent-tasting compound offers therapeutic benefits due to direct desensitization of TRPV1 receptors and/or by a rather more nonselective 'defunctionalization' of the sensory neurons bearing such receptors (Geppetti & Trevisani, 2004, Szallasi & Blumberg, 1999), but also to be useful in the development of an experimental model aimed at suppressing the conduction of nociceptive stimuli.

Based on this, our study aimed to develop an experimental model for suppression of the conduction of nociceptive stimuli generated at the TMJ region of rat using piperine, as well as determining the minimal concentration of piperine required to produce such effect.

2. Methods

2.1 Animals

This study used 20 female *Wistar* rats (200-250g) obtained from the Multidisciplinary Center for Biological Research (CEMIB – State University of Campinas (Unicamp), Brazil). Experimental procedures were conducted in accordance with the International Association for the Study of Pain guidelines for using laboratory animals. The Ethics Committee for Animal Experimentation of Unicamp approved all animal experimental procedures and protocols (n. 1859-1). The animals were maintained in a temperature controlled room ($23\pm 1^{\circ}\text{C}$), and housed in plastic cages with soft bedding (five/cage) on a 12-h light/dark cycle (lights on at 07:00 AM) with food and water available *ad libitum* for at least two months prior to the experiments.

2.2 Piperine injection

Three piperine solutions were prepared from commercially (Sigma-Aldrich) available stock piperine containing 4,0, 6,0, and 8,0 μg further diluted in 10% ethylic alcohol (Chemco, Ltda, São Paulo), 10% Tween (Dinâmica, Ltda, São Paulo), and 80% sterile saline solution (Med Flex®, Rio de Janeiro, Brazil). All animals were anesthetized with intraperitoneal ketamine (55mg/kg)-xylazine (5.5mg/kg) solution prior to TMJ injection, and were randomly assigned to receive 0 (sterile saline) (n=05), 0,04 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (n=05), 0,06 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (n=05), or 0,08 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (n=05) of piperine into their right TMJ. The injections were performed by one examiner blinded to the experimental design by palpating the zygomatic arch area and inserting a 30-gauge needle immediately inferior to the posteroinferior border. The needle was advanced in the anterior direction until reaching the posterolateral aspect of the condyle and 25 μl of the assigned solution was inserted. A cannula consisting of a polyethylene tube was connected to the needle and also to a

Hamilton syringe previously filled with one of the different concentrations of piperine (Roveroni et al, 2001).

After this, animals were placed back into their cages for a period of 8 to 12 days for nociceptive behavior testing: rubbing the orofacial region (Clavelou *et al*, 1995), flinching the head, and the sum of both behaviors (Roveroni et al, 2001). During this period, there was no restriction of food and water.

2.3 Testing procedures for nociceptive behavior

Animals were daily checked for estrous cycle by microscope examination of vaginal smears. Behavior testing was performed during the light phase (between 8:00 and 17:00 PM) by an examiner blinded to experimental manipulation. At the day of testing, estrous phase rats were individually placed in a chamber (30 X 30 X 30 cm mirrored wood, with a glass at the front side) for a 10-minute habituation period, during which no food or water were available. After this, animals were lightly anesthetized by inhalation of halothane (Sigma-Aldrich) to allow TMJ injection. A different examiner performed all injections, as previously described, and 25µl of a 2µg piperine solution was injected in the right TMJ. After regaining consciousness, animals were placed back into the mirrored chamber for counting the nociceptive responses. The nociceptive behavior characterized by rubbing the orofacial region (Clavelou et al, 1995) and flinching the head (Roveroni et al, 2001) was counted for 45 minutes divided into 9 blocks of 5 minutes. During each block, the amount of time that the animal spent rubbing the orofacial region was quantified, and considering that the head flinching behavior follows a uniform pattern of one second in duration, each flinching was expressed as one second (Gameiro et al, 2005 ; Roveroni et al, 2001), those behaviors were quantified by the number of times they happened. The examiner responsible for counting the nociceptive behaviors was blinded to the rat's group assignment (Roveroni et al, 2001).

Firstly, responses for piperine-induced nociceptive behaviors measured for 45 minutes were evaluated separately, and then their sum was also used for statistical analysis (Roveroni et al, 2001). After the behavior test, and according to the International Association for the Pain Study, all the animals were killed.

2.4 Statistical analysis

Data with homogeneity of variance were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) and multiple post-hoc comparisons were performed using the Bonferroni's test. Correlation between different concentrations of piperine and piperine-induced nociceptive behaviors was tested using Spearman's rank correlation coefficient. Probability level of less than 0.05 was considered statistically significant. Data obtained are presented in the figures and text as means \pm standard deviation.

3. Results

Although the time the animals spent rubbing the orofacial region or flinching the head seemed to decrease with increasing concentrations of piperine, the injection of piperine solution at concentrations up to 0,08 μ g/ml could not significantly decrease the amount of responses (Figure 1).

On the other hand, when the sum of both behaviors was considered, the injection of 0,08 μ g/ml piperine solution significantly decreased the amount of nociceptive responses ($p < 0.05$) compared to saline-treated animals (Figure 2). Figure 4 presents the time course of nociceptive responses evoked by 0,08 μ g/ml piperine solution characterized by rubbing the orofacial region, flinching the head, and the sum of both behaviors.

The graph on Figure 3 illustrates the time course of the sum of nociceptive behaviors induced by the injection of different concentrations of piperine into the TMJ. Overall, nociceptive responses evoked by all solutions, including saline, increased towards 10 minutes after injection, except for the solution concentrated at 0,04 μ g/ml, which resulted in the highest peak of nociceptive responses after 15 minutes of injection. After 15 minutes, the lower concentrations of piperine used (0,04 μ g/ml and 0,06 μ g/ml) alternated peaks of responses until 30 minutes after the injection, time at which nociceptive responses were lowest. Saline-treated animals presented nociceptive responses somewhat similar to animals treated with 0,06 μ g/ml piperine solution, except for the absence of alternated peaks of response. Interestingly, animals treated with 0,08 μ g/ml piperine solution generally exhibited the lowest nociceptive responses (Figure 4).

The injection of all solution into the TMJ resulted in a final peak of responses, which was lowest and earlier (30 minutes) for animals treated with 0,08 μ g/ml piperine solution, and higher and later (35 minutes) for the other solutions, including saline.

4. Discussion

The novelty of this study is the development of an experimental model of nociceptive behavior in females and the use of piperine to reduce the nociceptive stimulus conduction. The utilization of females is justified by the higher prevalence of TMJ pain in women (LeResche & Drangsholt, 2008; Isong et al, 2008; Lipton et al, 1993). Thus, the behavior test was conducted during the hormonal cycle - during diestrus - when animals present higher nociceptive response (Clemente et al, 2004). Another factor to be emphasized is the use of piperine to reduce the conduction of nociceptive stimuli. Under different concentrations, piperine activates the TRPV1 present in afferent C fiber and spreads nociceptive stimuli, and also desensitize or defunctionalize the receptor, blocking the stimulus conduction. (Roveroni et al, 2001). This model of pain in females using piperine has clinical relevance because it allows the study the mechanisms of chronic pain and inflammation in the TMJ, as well as analyzes the efficiency of drugs that act directly on the C fibers by blocking conduction of nociceptive stimulus.

Based on in these results, it was demonstrated that increasing concentrations of piperine solution injected into the rats TMJ seem to reduce the overall nociceptive responses up to 0.08 μ g/ml, concentration at which the sum of the commonly known nociceptive behaviors of rubbing the orofacial region and flinching the head was significantly reduced. To the best of our knowledge, the sum of these responses offers a clearer view of the animal's nociceptive behavior, once they are all responses triggered by the same nociceptive stimulus, and seem to complement each other (Figure 3).

It is noteworthy that all animals seemed to reduce their of nociceptive responses between 30 to 35 minutes after the injection, including saline-treated animals, after what responses increased again. Probably, the first phase of responses may be attributed to the effect of piperine on sensory nerves, which is a potent agonist of TRPV1 lower concentrations. During this initial phase, 0.08 μ g/ml piperine solution proved to be

sufficient to desensitize sensory nerves, as it reduced the nociceptive behavior of the animals. The second phase of responses, however, may be attributed to a subsequent development of inflammation and spinal cord sensitization due to the puncture and injection of the TMJ (Hunskaar & Hole, 1987), and 0.08 μ g/ml piperine solution also evoked less responses. The second phase of responses better characterizes overt pain and bears more resemblance to clinical pain than that provoked by a transient stimulus (Roveroni et al, 2001).

The first peak of nociceptive behavior may result from the action of piperine on fibers A δ present in the TMJ region, which are responsible for conducting acute and faster nociceptive stimuli. The second peak may be explained by sensitization of C fibers that were not desensitized previously by the injection of the higher concentration of piperine.

The fact that 0.08 μ g/ml piperine solution evoked less, but still, did evoke responses, seems to indicate that this concentration is capable of desensitizing, but not 'dysfunctionalizing' sensory nerves. That is, by desensitising sensory nerves but not 'dysfunctionalising' them, the conduction of nociceptive stimuli may be suppressed without completely inhibiting cell functions, which shall be extremely useful in future studies attempting to investigate the role of the sensory nervous systems in the development and maintenance of painful and inflammatory conditions, such as TMJ arthritis.

Studies conducted with animals have supported a role for TRPV1 receptors in the development of post-inflammatory hyperalgesia, and the expression of TRPV1 receptors has been shown to be up-regulated in a number of human disorders, such as inflammatory diseases and chronic pain conditions (Szallasi & Appendino, 2004), such as TMJ arthritis.

The regulation of TRPV1, however, is complex. It seems to be inactive at rest, but it can be activated by agonist agents, such inflammation (Szallasi & Appendino, 2004); enzymes can couple other key pain mediators, such as bradykinin B₂ to activate TRPV1 (Szallasi & Appendino, 2004). Adding up to that, TRPV1 is not only found in sensory neurons, but also in a variety of non-neuronal tissues, such as mast cells, lymphocytes, and glia (Szallasi & Appendino, 2004, Szallasi & Blumberg, 1999), indicating an intricate

feedback between the nervous and immunological systems underlying the hyperalgesia (Szallasi & Appendino, 2004).

Therefore, TRPV1 desensitisation using piperine seems to be promising, but the molecular mechanisms underlying desensitization have not been clarified (Liu & Simon, 1996, Szallasi & Appendino, 2004).

It has been proposed that dephosphorylation via phosphatases, such as calcineurin, may be responsible for the desensitization, although it possibly only explains rapid tachyphylaxis and not the long-lasting functional impairment that follows the agonist injection (Cortright & Szallasi, 2004).

Due to its lypophilic and unsaturated double bonds, it is conceivable that piperine may act directly on neuronal membranes and initiate lipid peroxidation. The consequences would be the rupture of neuronal membrane integrity and the release of reactive oxygen species, leading to cellular death via necrosis or apoptosis (McNamara et al, 2005).

Piperine also inhibits intracellular calcium oscillation in neuronal networks and suppresses spontaneous synaptic activities in terms of spontaneous synaptic currents, which may have direct action on the release of neurotransmitters (Fu et al, 2010).

Regardless of the mechanism involved, 0.04 μ g/ml piperine solution acted as a potent TRPV1 agonist, as these animals showed the highest amount of nociceptive behavior. It is possible to suggest that the 0.06 μ g/ml piperine solution began to desensitize sensory neurons via its action on TRPV1, as animals treated with this solution presented less nociceptive behaviors, and somewhat similar to that evoked by the injection of saline. Finally, the injection of 0.08 μ g/ml piperine solution into the TMJ of rats proved to be sufficient to desensitize sensory neurons, as it evoked the lesser nociceptive responses on both phases of response.

Therefore, it can be concluded that the injection of 0.08 μ g/ml piperine solution into the TMJ of rats is capable of suppressing the conduction of nociceptive stimuli, without 'defunctionalization'. With regard to TMJ arthritis, the development of this experimental model is extremely important for further studies attempting to evaluate if

central sensitization of primary sensory neurons is implicated on the impairment of both joints in bilateral cases.

5. Acknowledgments

We acknowledge CNPq for financial and material support.

6. References

1. Clavelou P, Dallel R, Orliaguet T, Woda A. The orofacial formalin test in rats: effects of different formalin concentration. *Pain*. 1995; 62 (3): 295-301.
2. Clemente JA, Parada CA, Veiga MCA, Gear RW, Tambeli CH. Sexual dimorphism in the antinociception mediated by kappa opioid receptors in the rat temporomandibular joint. *Neurosci Lett*. 2004; 372(3):250-55.
3. Cortright DN, Szallasi A. Biochemical pharmacology of the vanilloid receptor TRPV1: An update. *Eur J Biochem*. 2004; 271 (10): 1814-1819.
4. Fiorentino PM, Tallents RH, Miller JH, Brouxhon SM, O'Banion MK, Puzas JE, Kyrkanides S. Spinal interleukin - 1 β in a mouse model of arthritis and joint pain. *Arthritis Rheum*. 2008; 58(10): 3100-3109.
5. Fu M, Sun Z, Zuo H. Neuroprotective effect of piperine on primarily cultured hippocampal neurons. *Biol Pharm Bull*. 2010; 33 (4): 598-603.
6. Gameiro GH, Andrade AS, Castro M, Pereira LF, Tambeli CH, Veiga MCFA. The effects of restraint stress on nociceptive responses induced by formalin injected in rat's TMJ. *Pharmacol Biochem Behav*. 2005; 82(2): 338-344.
7. Geppetti P, Trevisani M. Activation and sensitisation of the vanilloid receptor: role in gastrointestinal inflammation and function. *Br J Pharmacol*. 2004; 141(8): 1313-1320.
8. Grandmont P. Osteoarthrosis/osteoarthritis in the temporomandibular joints. *Int J Prosthodont*. 2007; 20(4): 357-8.
9. Green, BG. Rapid recovery from capsaicin desensitization during recurrent stimulation. *Pain*, 1996; 68, 245–253.
10. Hunskaar S, Hole K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain*. 1987; 30:104–114.

11. Isong U, Gansky SA, Plesh O. Temporomandibular joint and muscle disorder – type pain in US adults: the national health interview. *J Orofac Pain*. 2008; 22(4): 317-22.
12. Kyrkanides S, Fiorentino PM, Miller JH, Gan Y, Lai YC, Shaftel SS, et al. Amelioration of pain and histopathologic joint abnormalities in the Col1-IL-1_XAT mouse model of arthritis by intraarticular induction of μ -opioid receptor into the temporomandibular joint. *Arthritis Rheum*. 2007;56:2038–48.
13. Lai YC, Shaftel SS, Miller JH, Tallents RH, Chang Y, Pinkert CA, et al. Intraarticular induction of interleukin-1 β expression in the adult mouse, with resultant temporomandibular joint pathologic changes, dysfunction, and pain. *Arthritis Rheum* 2006; 54:1184–97.
14. LeResche L, Drangsholt M. Epidemiology of orofacial pain: prevalence, incidence and risk factors. In: Sessle BJ, Lavigne GJ, Lund JP, Dubner R. *Orofacial pain: from basic science to clinical management*. 2.ed. Chicago: Quintessence Books; 2008. p. 13-18.
15. Lipton JA, Ship JA, Larach-Robinson D. Estimated prevalence and distribution of reported orofacial pain in the United States. *J Am Dent Assoc*. 1993; 124(10):115-21.
16. Liu L, Simon SA. Similarities and differences in the currents activated by capsaicin, piperine and zingerone in rat trigeminal ganglion cells. *J Neurophysiol*. 1996; 76(3): 1858- 1869.
17. McNamara FN, Randall A, Gunthorpe MJ. Effects of piperine, the pungent component of Black pepper, at the human vanilloid receptor (TRPV1). *Br J Pharmacol*. 2005; 144 (6): 781-790.
18. Noguchi M, Kurose M, Yamamura K, Inoue M, Taguchi Y, Sessle BJ, Yamada Y. Unilateral application of an inflammatory irritant to the rat temporomandibular joint region produces bilateral modulation of the jaw-opening reflex. *Brain Res Bull*. 2005; 67 (3): 182-188.
19. Roveroni RC, Parada CA, Veiga MCFA, Tambeli CH. Development of a behavioral model of TMJ pain in rats: the TMJ formalin test. *Pain*. 2001; 94(2): 185-91.
20. Szallasi A, Appendino G. Vanilloid receptor TRPV1 antagonists as the next generation of painkillers. Are we putting the cart before the horse? *J Med Chem*. 2004; 47(11): 2717-2723.

21. Szallasi A, Blumberg, PM. Characterization of vanilloid receptors in the dorsal horn of pig spinal cord. *Brain Res*, 1991; 547, 335–338
22. Szallasi A, Blumberg PM. Vanilloid (capsaicine) receptors and mechanisms. *Pharmacol Rev*. 1999; 51(2): 159-212.
23. Yang L, Blumbergs PC, Jones NR, Manavis J, Sarvestani GT, Ghabriel MN. Early expression and cellular localization of proinflammatory cytokines interleukin-1, interleukin-6, and tumor necrosis factor- α in human traumatic spinal cord injury. *Spine* 2004;29:966–71
24. Zarb GA, Carlsson GE. Temporomandibular disorders: osteoarthritis. *J Orofac Pain*. 1999; 13(4): 295-306.

Figures

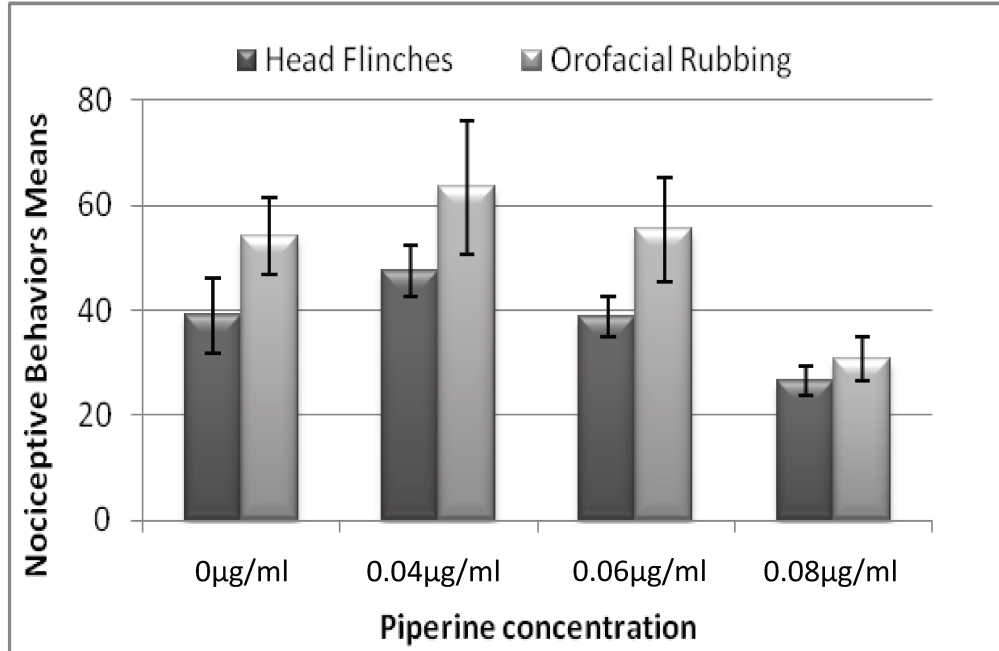


Figure 1. Effect of increasing concentrations of TMJ piperine on the duration of head flinches or of the rubbing the orofacial region behavior. Each column represent the group mean.

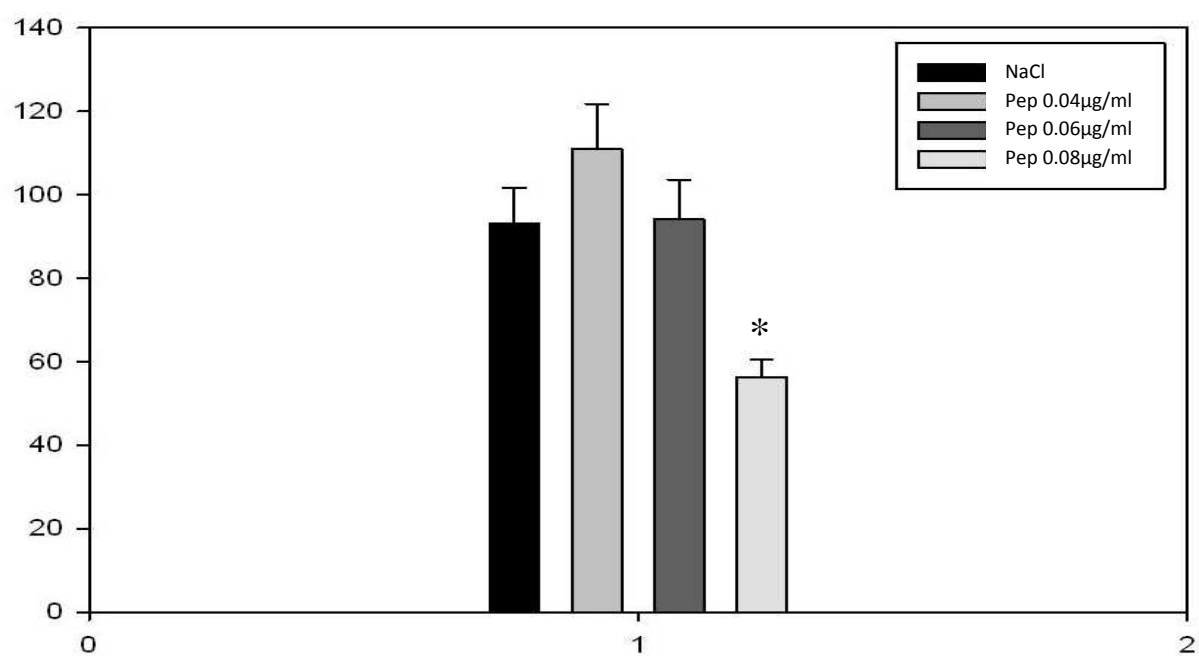


Figure 2. Effect of increasing concentrations of TMJ piperine on the sum of the flinching and rubbing behaviors. (*) indicates a significant difference from control group.

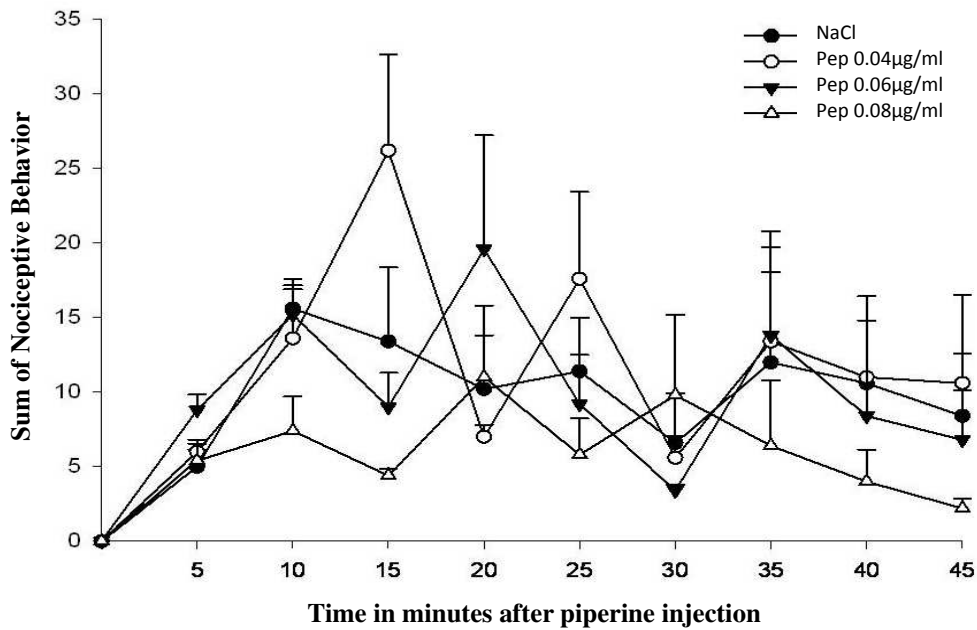


Figure 3. Time course of the sum of nociceptive behaviors of piperine characterized by head flinches of orofacial rubbing. Each drawing represents the average of the sum of each period of 5 min of assessment behavioral.

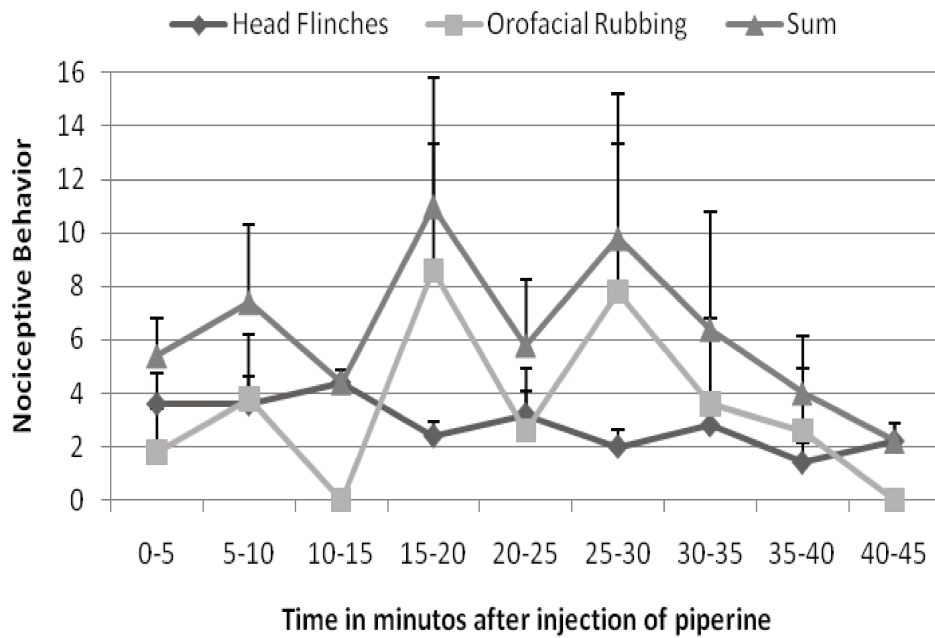


Figure 4. Time course of nociceptive behaviors: head flinches, orofacial rubbing and the sum of behaviors (means and standard deviation).

Conclusão

Baseados nos dados obtidos neste experimento, a aplicação de solução de 0,08µg/ml de piperina na região de ATM de ratos provocou uma redução significativa nos comportamentos nociceptivos destes animais.

Appelgren A, Appelgren B, Kopp S, Lundeberg T, Theodorsson E. Substance P – associated increase of intra-articular temperature and pain threshold in the arthritic TMJ. *J Orofacial Pain*. 1998; 12 (2): 101-107.

Bonjardin LR, da Silva AP, Gameiro GH, Tambeli CH, Veiga MCFA. Nociceptive behavior induced by mustard oil injection into the temporomandibular joint is blocked by a peripheral non-opioid anagesic and a central opioid analgesic. *Pharmacol Biochem Behav*. 2009; 91(3): 321-326.

Bonnet CS, Walsh DA. Osteoarthritis, angiogenesis and inflammation. *Rheumatology*. 2005; 44 (1):7-16.

Boudaka A, Wörl J, Shiina T, Neuhuber WL, Kobayashi H, Shimizu Y, Takewaki T. Involvement of TRPV1-dependent and –independent components in the regulation of vagally induced contractions in the esophagus. *Eur J Pharmacol*. 2007; 556 (1-3): 157-165.

Carlsson GE. Epidemiology and treatment need for temporomandibular disorders. *J Orofac Pain*. 1999; 13 (4): 232-237.

Cortright DN, Szallasi A. Biochemical pharmacology of the vanilloid receptor TRPV1: an update. *Eur J Biochem*. 2004; 271 (10): 1814-1819.

Curtis CL, Rees SG, Little CB, Flannery CR, Hughes CE, Wilson C, Dent CM, Otterness IG, Harwood JL, Caterson B. Pathologic indicators of degradation and inflammation in human osteoarthritic cartilage are abrogated by exposure to n-3 fatty acids. *Arthritis Rheum*. 2002; 46(6): 1544-1553.

Fiorentino PM, Cairns BE, Hu JW. Development of inflammation after application of mustard oil glutamate to the rat temporomandibular joint. *Arch Oral Biol.* 1999; 44(1): 27-32.

Fiorentino PM, Tallents RH, Miller JH, Brouxhon SM, O'Banion MK, Puzas JE, Kyrkanides S. Spinal Interleukin - 1 β in a Mouse Model of Arthritis and Joint Pain. *Arthritis Rheum.* 2008; 58(10): 3100-3109.

Flake NM, Hermanstynne TO, Gold MS. Testosterone and estrogen have opposing actions on inflammation-induced plasma extravasation in the rat temporomandibular joint. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2006; 291 (2): R343-R348.

Fu M, Sun Z, Zuo H. Neuroprotective effect of piperine on primarily cultured hippocampal neurons. *Biol Pharm Bull.*, v. 33, n. 4, p. 598-603, 2010.

Gameiro GH, Andrade AS, Castro M, Pereira LF, Tambeli CH, Veiga MCFA. The effects of restraint stress on nociceptive responses induced by formalin injected in rat's TMJ. *Pharmacol Biochem Behav.* 2005; 82(2): 338-344.

Geppetti P, Trevisan M. Activation and sensitization of the vanilloid receptor: role in gastrointestinal inflammation and function. *Br J Pharmacol.* 2004; 141 (8): 1313-1320.

Gonçalves DAG, Fabbro AL, Campos JADB, Bigal ME, Speciali JG. Symptoms of temporomandibular disorders in the population: an epidemiological study. *J Orofac Pain.* 2010; 24 (3): 270-278.

Goldring SR, Goldring MB. The role of cytokines in cartilage matrix degeneration in osteoarthritis. *Clin Orthop Relat Res.* 2004; 427 (Suppl): S27-36.

Grandmont P. Osteoarthrosis/osteoarthritis in the temporomandibular joints. *Int J Prosthodont.* 2007; 20(4): 357-8.

Guo W, Wang H, Watanabe M, Shimizu K, Zou S, LaGraize SC *et al.* Glial-cytokine-neuronal interactions underlying the mechanisms of persistent pain. *J Neurosci.* 2007; 27 (22): 6006-6018.

Khan AA, Ren K, Hargreaves KM. Neurochemicals factors in injury and inflammation of orofacial tissues. In: Sessle BJ, Lavigne GJ, Lund JP, Dubner R. *Orofacial pain: from basic science to clinical management.* 2.ed. Chicago: Quintessence Books; 2008. p. 45-52.

Kubota E, Imamura H, Kubota T, Shibata T, Murakami KI. Interleukin 1 β and stromelysin (MMP3) activity of synovial fluid as possible markers of osteoarthritis in the temporomandibular joint. *J Oral Maxillofac Surg.* 1997; 55(1): 20-27.

Kyrkanides S, Tallents RH, Macher DJ, Olschowka JA, Stevens SY. Temporomandibular joint nociception: effects of capsaicin on substance P-like immunoreactivity in the rabbit brain stem. *J Orofac Pain.* 2002; 16 (3): 229-36.

Kyrkanides S, Fiorentino PM, Miller JH, Gan Y, Lai YC, Shaftel SS, *et al.* Amelioration of pain and histopathologic joint abnormalities in the Col1-IL-1 β ^{XAT} mouse model of arthritis by intraarticular induction of μ -opioid receptor into the temporomandibular joint. *Arthritis Rheum.* 2007; 56(6): 2038-2048.

Lai YC, Shaftel SS, Miller JH, Tallents RH, Chang Y, Pinkert CA *et al.* Intraarticular induction of interleukin - 1 β expression in the adult mouse, with resultant temporomandibular joint pathologic changes, dysfunction and pain. *Arthritis Rheum.* 2006; 54 (4): 1184-97.

LeResche L, Saunders K, Von Korff MR, Barlow W, Dworking SF. Use of exogenous hormones and risk of temporomandibular disorder pain. *Pain.* 1997; 69 (1): 153-160.

LeResche L, Drangsholt M. Epidemiology of orofacial pain: prevalence, incidence and risk factors. In: Sessle BJ, Lavigne GJ, Lund JP, Dubner R. Orofacial pain: from basic science to clinical management. 2.ed. Chicago: Quintessence Books; 2008. p. 13-18.

Lipton JA, Ship JA, Larach-Robinson D. Estimated prevalence and distribution of reported orofacial pain in the United States. *J Am Dent Assoc.* 1993; 124 (10): 115-121.

Liu L, Simon SA. Similarities and differences in the currents activated by capsaicin, piperine and zingerone in the trigeminal ganglion cells. *J Neurophysiol.* 1996; 76(3): 1858-1869.

Lobbezoo F, Drangsholt M, Peck C, Sato H, Kopp S, Svensson P. Topical review: new insights into the pathology and diagnosis of disorders of the temporomandibular joint. *J Orofac Pain.* 2004; 18(3): 181-191.

Niissalo S, Hukkanen M, Imai S, Törnwall J, Kontinen YT. Neuropeptides in experimental and degenerative arthritis. *Ann NY Acad Sci* 2002; 966:384-99.

Nishimura M, Segami N, Kaneyama K, Suzuki T, Miyamaru M. Relationships between pain-related mediators and both synovitis and joint pain in patients with derangements and osteoarthritis of the temporomandibular joint. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002; 94(3): 328-32.

Roveroni RC, Parada CA, Veiga MCFA, Tambeli CH. Development of a behavioral model of TMJ pain in rats: the TMJ formalin test. *Pain.* 2001; 94(2): 185-91.

Sessle BJ, Iwata K, Dubner R. Central nociceptive pathways. In: Sessle BJ, Lavigne GJ, Lund JP, Dubner R. Orofacial pain: from basic science to clinical management. 2.ed. Chicago: Quintessence Books; 2008. p. 35-42.

Shafer D, Assael L, White LB, Rossomando EF. Tumor necrosis factor- α as a biochemical marker of pain and outcome in temporomandibular joints with internal derangements. *J Oral Maxillofac Surg.* 1994; 52(8): 786-91.

Suzuki T, Segami N, Kaneyama K, Nishimura M, Nojima T. Specific expression of interleukin-1 β in temporomandibular joints with internal derangement: correlation with clinical finding. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1999; 88(4): 413-17.

Szallasi A. Piperine: researches discover new flavor in an ancient spice. *Trends Pharmacol Scib.* 2005; 26 (9): 437-439.

Szallasi A, Appendino G. Vanilloid receptor TRPV1 antagonists as the next generation of painkillers. Are we putting the cart before the horse? *J Med Chem.* 2004; 47(11): 2717-2723.

Szallasi A, Blumberg PM. Vanilloid (capsaicine) receptors and mechanisms. *Pharmacol Rev.* 1999; 51(2): 159-212.

Takahashi T, Kondoh T, Fukuda M, Yamazaki Y, Toyosaki T, Suzuki R. Proinflammatory cytokines detectable in synovial fluids from patients with temporomandibular disorders. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998; 85(2): 135-41.

Zarb GA, Carlsson GE. Temporomandibular disorders: osteoarthritis. *J Orofac Pain.* 1999; 13(4): 295-306.

ANEXO I



CEEA/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA/Unicamp

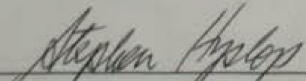
CERTIFICADO

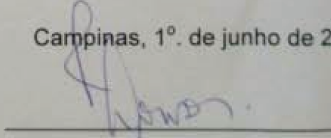
Certificamos que o Protocolo nº 1859-1, sobre "Influência do estímulo inflamatório unilateral na indução de osteoartrite bilateral das articulações temporomandibulares de ratos", sob a responsabilidade de Profa. Dra. Célia Marisa Rizzatti Barbosa / Ana Paula Varela Brown Martins, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em 1º. de junho de 2009.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1859-1, entitled "Influence of the unilateral inflammatory stimulus in induction of bilateral osteoarthritis in rat temporomandibular joints", 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 June 1, 2009.

Campinas, 1º. de junho de 2009.


Prof. Dr. Stephen Hyslop
Presidente em exercício


Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEEA – Unicamp
Caixa Postal 6109
13063-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>

ANEXO II

Tabela 1: Comportamento dos grupos com diferentes soluções avaliados no período de 45 minutos (média e desvio padrão).

Solução Injetada	Solução Fisiológica	4µg de Piperina	6µg de Piperina	8µg de Piperina
Comportamento Nociceptivo				
Deslocamento da Cabeça	39 (±7,17) ^a	47,6 (± 4,91) ^a	38,8 (±3,76) ^a	25,6 (±2,80) ^a
Coçar região orofacial	54,2 (± 7,29) ^a	63,4 (± 12,82) ^a	55,4 (± 9,95) ^a	30,8 (± 4,20) ^a
Soma dos Comportamentos	93,2 (± 8,45) ^a	111 (± 10,79) ^a	94,2 (± 9, 40) ^a	56,4 (± 4,18) ^b

(Letra diferente referente à diferença estatisticamente significativa $p < 0.05$ na comparação entre grupos).

Anexo III

Confirmação de submissão ao periódico *Pain*

The screenshot shows a web browser window displaying the Elsevier PAIN journal submission confirmation page. The browser's address bar shows the URL <http://ees.elsevier.com/pain/default.asp>. The page header includes the PAIN logo, navigation links (home, main menu, submit paper, guide for authors, register, change details, log out), and user information (Username: Ana, Role: Author). The main content area is titled "Submissions Being Processed for Author Ana Paula Martins" and shows a table with one submission. The table has columns for Action, Manuscript Number, Title, Initial Date Submitted, Status Date, and Current Status. The submission details are: Manuscript Number (blank), Title "Experimental model for suppression of nociceptive stimuli in the TMJ of female rats with piperine", Initial Date Submitted "Aug 9 2011 11:30:58", Status Date "Aug 9 2011 11:30:58", and Current Status "Manuscript Submitted to Journal". The page also includes a "Fazer login" button, a "Contact us Help" link, and a "Version: EES 2011.1" label. At the bottom, there are links for "Help", "Privacy Policy", and "Terms and Conditions", and a copyright notice "© 2006 - 2011 Elsevier BV".

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
Action Links		Experimental model for suppression of nociceptive stimuli in the TMJ of female rats with piperine	Aug 9 2011 11:30:58	Aug 9 2011 11:30:58	Manuscript Submitted to Journal

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

<< Author Main Menu

Help | Privacy Policy | Terms and Conditions © 2006 - 2011 Elsevier BV