

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS**

Wladimir Dal Bó

**EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO EUGENOL EM UM
MODELO DE DOR MUSCULAR OROFACIAL EM
CAMUNDONGOS: PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES
GLUTAMATÉRGICOS, TRPs E ASICs**

Florianópolis, (SC)
2012

Wladimir Dal Bó

**EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO EUGENOL EM UM
MODELO DE DOR MUSCULAR OROFACIAL EM
CAMUNDONGOS: PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES
GLUTAMATÉRGICOS, TRPs E ASICs**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências para a obtenção do grau de Doutor em Neurociências
Orientador: Prof. Dr. Adair Roberto Soares Santos.

Florianópolis, (SC)
2012

FICHA CATALOGRÁFICA

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

Dal Bó, Wladmir

Efeito antinociceptivo do eugenol em um modelo de dor muscular orofacial em camundongos: participação dos receptores glutamatérgicos, TRPs E ASICs Wladmir Dal Bó; orientador, Adair Roberto Soares Santos - Florianópolis, SC, 2013.

137 p. ; 21cm

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Neurociências.

Inclui referências

1. Neurociências. 2. Eugenol. Masseter. Dor orofacial. Dor muscular. I. Santos, Adair Roberto Soares . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós- Graduação em Neurociências. III. Título.

WLADMIR ANTÔNIO DE SOUZA DAL BÓ

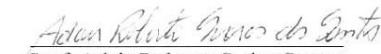
**”EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO EUGENOL EM UM
MODELO DE DOR MUSCULAR OROFACIAL EM
CAMUNDONGOS: PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES
GLUTAMATÉRGICOS, TRPs E ASICs”.**

Esta tese foi julgada e aprovada para a obtenção do Grau de Doutor em Neurociências na área de Neuropsicologia no Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina.

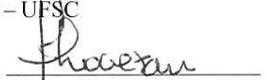
Florianópolis, 23 de novembro de 2012.


Profª. Ana Lúcia S. Rodrigues
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:


Prof. Adair Roberto S. dos Santos
Orientador – UFSC


Profª. Ana Lúcia S. Rodrigues
Membro - UFSC


Profª. Anna Paula Piovezan
Membro da Banca Externo


Prof. Jamir João Sardá Júnior
Membro da Banca Externo


Prof. Mabel M. R. Cordeiro
Membro - UFSC


Prof. Rubens Rodrigues Filho
Membro da Banca Externo

Dedico esse trabalho a minha esposa Patrícia por toda a amizade, compreensão e amor depositados em mim e a minha filha Helena, meu anjo que ainda está por vir, mas que já me deu forças para que eu pudesse alcançar meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu orientador, a quem admiro muito, o Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos por toda a paciência, ensinamentos e confiança depositados em mim.

Á todos os professores da pós-graduação em neurociências, que contribuíram para o enriquecimento dos meu conhecimentos.

Ao funcionário da pós graduação Nivaldo, pela competência e disposição com que realiza seu trabalho em função de nós alunos.

Aos colegas do laboratório de Neurobiologia da Dor e Inflamação da UFSC: Marina, Chico, Ney, Ana, Serginho, Catarina, Leidi, Daniel, Bira, Gaúcho, Morgana, Débora, Fran, Murilo, pela amizade, ajuda e boa convivência.

Agradeço especialmente a Ana Paula, Leidi, Daniel, Catarina, Marina e Ney, pessoas especiais que me ajudaram de alguma forma na realização do meu trabalho.

Á minha família, meu pai, minha mãe e meus irmãos Pity e Léo e minha esposa Patrícia por toda a força, apoio, por compreenderem a minha ausência e sempre acreditarem em mim.

Tudo posso naquele que me fortalece

Filipenses 4:10-19

RESUMO

As Disfunções Temporomandibulares (DTMs) compreendem um grupo de distúrbios que podem acometer os músculos da mastigação e/ou as articulações temporomandibulares. O entendimento sobre os mecanismos da dor envolvidos nas DTMs ainda não está totalmente elucidado, entretanto, têm sido sugerido que os receptores glutamatérgicos e os receptores da família dos TRPs (*Transient receptor potential*), especialmente TRPV1, poderiam estar envolvidos nos mecanismos periféricos destas condições. O eugenol é o maior constituinte do óleo do cravo-da-índia (80 - 95 %) (*Syzygium aromaticum*, Myrtaceae). Dentre suas inúmeras propriedades, o efeito analgésico tem sido um dos mais estudados atualmente. No presente estudo, inicialmente foi confirmado que o eugenol promoveu efeito antinociceptivo em camundongos quando administrado pelas vias intraperitoneal (i.p.) e oral (v.o.) frente a nocicepção dor aguda induzida pelo ácido acético (i.p.) e glutamato (i.pl.). Além disso, foi demonstrado que o eugenol foi efetivo em reduzir a dor orofacial induzida pelos agonistas glutamatérgicos ionotrópicos NMDA, AMPA e cainato, bem como dos metabotrópicos do grupo 1 e 2 (*trans*-ACPD). A coadministração de doses subativas de eugenol com antagonistas glutamatérgicos ionotrópicos (MK-801, CNQX) e metabotrópicos (MCPG) reduziu marcadamente a dor orofacial induzida por seus respectivos agonistas glutamatérgicos, evidenciando-se assim uma efetividade destes três compostos em produzir um efeito sinérgico. O eugenol também reduziu a nocicepção causada pelos agonistas dos receptores TRPV1, TRPA1 e TRPM8 (capsaicina, cinamaldeído e mentol, respectivamente), bem como dos receptores ASICs (salina acidificada) e, similarmente ao sistema glutamatérgico, a coadministração de doses subativas de eugenol com antagonistas dos receptores TRPV1, TRPA1 e TRPM8 (capsazepina, cânfora e vermelho de rutênio) e ASICs (amilorida) inibiram de forma sinérgica a nocicepção induzida pelos respectivos agonistas. O presente trabalho demonstrou que o eugenol é efetivo em reduzir a nocicepção muscular orofacial, atuando pelo menos em parte via receptores glutamatérgicos, receptores TRPs, e ASICs. Os resultados aqui apresentados sugerem que o eugenol pode constituir-se em uma nova alternativa de tratamento para o controle das DTMs musculares quando administrado isoladamente ou em associação com as drogas antagonistas utilizadas neste estudo.

Palavras-chave: Eugenol. Masseter. Dor orofacial. Dor muscular.

ABSTRACT*

Temporomandibular Disorders (TMD) comprise a group of disorders that can affect the chewing muscles and/or temporomandibular joints. The understanding of pain mechanisms involved in TMDs are not yet fully elucidated, however, it has been suggested that glutamate and transient receptor potential (TRP), especially TRPV1, could be involved in the peripheral mechanisms of these conditions. Eugenol is the major constituent of the oil of clove (80-95%) (*Syzygium aromaticum*, *Myrtaceae*). Among its numerous properties, its analgesic effect has been one of the most studied nowadays. In this study, it was initially confirmed that eugenol promoted antinociceptive effect when administered intraperitoneally (i.p.) and orally (p.o.) in classical models of acute pain induced by acetic acid and glutamate. Moreover, it was demonstrated that eugenol was effective in reducing orofacial pain induced by the glutamate ionotropic agonists NMDA, AMPA and kainate, as well as metabotropic group 1 and 2 (trans-ACPD). Coadministration of subactive doses of eugenol with ionotropic (MK-801, CNQX) and metabotropic (MCPG) glutamate antagonists markedly reduced orofacial pain induced by their respective glutamatergic agonists. This can demonstrate an effectiveness of these compounds to produce a synergistic effect. Eugenol was also able to reduce nociception caused by TRPV1, TRPA1 and TRPM8 receptor agonists (capsaicin, cinnamaldehyde and menthol, respectively) as well as receptor ASICs (acidified saline). In addition, the coadministration of subactive doses of eugenol with TRPV1, TRPA1, TRPM8, and ASICs receptor antagonists (capsazepine, camphor, ruthenium red, and amiloride, respectively), synergistically inhibited the nociception induced by their respective agonists. The present study demonstrated that eugenol is effective in reducing muscle orofacial nociception, acting at least in part via glutamate receptors, TRPs, and ASICs. The results presented here suggest that the eugenol could be a new alternative treatment for the control of muscular TMD when administered alone or in combination with the antagonists used in this study.

Keywords: Eugenol. Masseter. Orofacial Pain. Muscle Pain.

* Tradução por Wladimir Dal Bó

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Mecanismo de ação nociceptiva dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos e metabotrópicos.....	31
Figura 2- Temperaturas de ativação dos diferentes canais TRPs.....	33
Figura 3- Mecanismo de ação nociceptiva dos receptores TRPs e ASICs.....	43
Figura 4- Estrutura química do eugenol.....	52
Figura 5- Efeito antinociceptivo do eugenol administrado pelas vias oral (30-300 mg/kg, painel A) e intraperitoneal (30-100 mg/kg, painel B) sobre a nocicepção induzida por ácido acético em camundongos.....	67
Figura 6- Efeito antinociceptivo do eugenol administrado pela via intraperitoneal (0,3-100 mg/kg) sobre a nocicepção induzida por glutamato (20 μ mol/ pata) em camundongos.A solução salina foi utilizada como controle (10 ml/kg, i.p.).....	68
Figura 7- Efeito antinociceptivo do eugenol administrado pela via intraperitoneal (10 mg/kg, i.p.) no comportamento nociceptivo induzido pela injeção intratecal de glutamato, NMDA (450 pmol), AMPA (135 pmol), cainato (110 pmol) e trans-ACPD (50 nmol) em camundongos.....	69
Figura 8- Efeito do eugenol sobre a nocicepção muscular orofacial induzida por glutamato em camundongos.....	71
Figura 9- Efeito do NMDA injetado no músculo masséter de camundongos.....	73
Figura 10- Efeito do AMPA injetado no músculo masséter de camundongos.....	75
Figura 11- Efeito do cainato injetado no músculo masséter de camundongos.....	77
Figura 12- Efeito do trans-ACPD injetado no músculo masséter de camundongos.....	79
Figura 13- Efeito da capsaicina injetada no músculo masséter de camundongos.....	81

Figura 14- Efeito do cinamaldeído injetado no músculo masséter de camundongos.....	83
Figura 15- Efeito do mentol injetado no músculo masséter de camundongos.....	85
Figura 16- Efeito da salina acidificada injetado no músculo masséter de camundongos.....	87
Figura 17- Prováveis mecanismos de ação antinociceptiva do eugenol envolvendo o sistema glutamatérgico.....	97
Figura 18- Possível interação dos canais TRPs com o glutamato no efeito antinociceptivo do eugenol.....	102
Figura 19- Prováveis mecanismos de ação antinociceptiva do eugenol envolvendo os canais TRPs e ASICs.....	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Histórico dos canais TRPs.....	34
Tabela 2- Descrição da ação e seletividade das substâncias utilizadas nos experimentos.....	60

LISTA DE ABREVIÇÕES

AC	Adenilil Ciclase
AMPA	Ácido-amino-3-hydroxi-5-methyl-4-isoxazolepropionico
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
ASICs	Canais iônicos sensíveis a ácido
ATMs	Articulações Temporomandibulares
ATP	Trifosfato de adenosina
B2	Receptor de bradicinina
Ca ²⁺	Cálcio
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
COX	Cicloxigenase
DAG	Diacilglicerol
DTMs	Disfunções Temporomandibulares
EP	Receptor de prostaglandina
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GN	Gânglio nodal
GRD	Gânglio da raiz dorsal
GT	Gânglio trigeminal
iGluRs	Receptores glutamatérgicos ionotrópicos
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
IP3	Inositol trifosfato
K ⁺	Potássio
LOX	Lipoxigenase
mGluRs	Receptores glutamatérgicos metabotrópicos
Mg ²⁺	Magnésio
Na ⁺	Sódio
NGF	Fator de crescimento neural
NMDA	N-methyl-D-aspartâmico
P2Y	Receptor purinérgico 2Y
PG	Ponto gatilho
PIP2	Fosfatidil inositol bifosfato
PKA	Proteína quinase A

PKC	Proteína quinase C
PLA2	Fosfolipase A2
PLC	Fosfolipase C
SNC	Sistema Nervoso Central
SP	Substância P
RNAm	Ácido ribonucleico mensageiro
TRP	Receptor de Potencial Transitório
TRPA1	Receptor de Potencial Transitório relacionado a Proteína Anquirina 1
TRPM8	Receptor de Potencial Transitório relacionado a Melastatina 8
TRPV1	Receptor de Potencial Transitório Vanilóide 1
V1	Ramo oftálmico do nervo trigêmeo
V2	Ramo maxilar do nervo trigêmeo
V3	Ramo mandibular do nervo trigêmeo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	27
1.1 DOR.....	27
1.2 NOCICEPTORES.....	28
1.3 GLUTAMATO: UM MEDIADOR NOCICEPTIVO.....	29
1.4 OS CANAIS TRPS (TRANSIENT RECEPTORS POTENTIAL)...	32
1.4.1 Receptores TRPV1.....	34
1.4.2 Receptores TRPA1.....	36
1.4.3 Receptores TRPM8.....	38
1.5 RECEPTORES ASICS (CANAL IÔNICO SENSÍVEL A ÁCIDO).....	40
1.6 DISFUNÇÕES TEMPOROMANDIBULARES.....	44
1.6.1 Conceito.....	44
1.6.2 Dados epidemiológicos.....	44
1.6.3 Etiologia das DTMs.....	45
1.6.4 Dor miofascial.....	45
1.7 O NERVO TRIGÊMEO E O COMPLEXO SENSORIAL.....	47
1.7.1 Núcleos sensoriais do trigêmeo.....	48
1.7.2 Percepção da dor orofacial.....	49
1.7.3 Possíveis receptores envolvidos na dor muscular orofacial.....	49
1.8 EUGENOL: BIOLOGIA, QUÍMICA E USO COMERCIAL.....	51
1.8.1 Efeitos biológicos e farmacológicos.....	52
2 JUSTIFICATIVA.....	56
3 OBJETIVOS.....	58
3.1 OBJETIVO GERAL.....	58
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	58

4 METODOLOGIA.....	59
4.1 ANIMAIS.....	59
4.1 DROGAS E REAGENTES.....	59
4.2 AVALIAÇÃO DO POSSÍVEL EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO EUGENOL.....	60
4.3 AVALIAÇÕES COMPORTAMENTAIS.....	61
4.3.1 Efeito do eugenol sobre a nocicepção induzida por ácido acético injetado na região intraperitoneal de camundongos.....	61
4.3.2 Efeito do eugenol sobre a nocicepção induzida pelo glutamato injetado na pata de camundongos.....	61
4.3.3 Efeito do eugenol sobre a nocicepção induzida pela injeção intratecal de glutamato e agonistas dos receptores glutamatérgicos	62
4.3.4 Modelo de nocicepção muscular orofacial.....	62
4.3.5 Efeito dos antagonistas dos receptores glutamatérgicos, TRPs e salina acidificada frente à nocicepção muscular orofacial induzida pelos seus respectivos agonistas.....	64
4.3.6 Avaliação do efeito antinociceptivo do eugenol sobre a nocicepção muscular orofacial induzida pelo glutamato e pelos agonistas dos receptores glutamatérgicos,TRPs e ASICs.....	65
4.3.7 Avaliação do possível efeito sinérgico do eugenol com os antagonistas glutamatérgicos e TRPs na nocicepção muscular orofacial induzida por seus respectivos agonistas.....	65
4.3.8 Análise estatística.....	66
5 RESULTADOS.....	67
5.1 EFEITO DO EUGENOL SOBRE A NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA INJEÇÃO INTRAPERITONEAL DE ÁCIDO ACÉTICO EM CAMUNDONGOS.....	67
5.2 EFEITO DO EUGENOL SOBRE A NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA INJEÇÃO INTRAPLANTAR DE GLUTAMATO EM CAMUNDONGOS.....	68
5.3 EFEITO DO EUGENOL SOBRE A NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA INJEÇÃO INTRATECAL DE GLUTAMATO E AGONISTAS DOS RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS EM CAMUNDONGOS	69

5.4 EFEITO DO EUGENOL SOBRE A NOCICEPÇÃO MUSCULAR OROFACIAL INDUZIDA PELA INJEÇÃO DE GLUTAMATO NO MÚSCULO MASSETER DE CAMUNDONGOS.....	70
5.5 EFEITO DO MK-801 SOBRE A NOCICEPÇÃO MUSCULAR OROFACIAL INDUZIDA PELA INJEÇÃO DE NMDA NO MÚSCULO MASSETER DE CAMUNDONGOS.....	72
5.6 EFEITO ANTINOCICEPTIVO SINÉRGICO DO EUGENOL E DO MK-801 NO MODELO DE NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA INJEÇÃO DE NMDA NO MÚSCULO MASSETER DE CAMUNDONGOS.....	72
5.7 EFEITO DO CNQX SOBRE A NOCICEPÇÃO MUSCULAR OROFACIAL INDUZIDA PELA INJEÇÃO DE AMPA NO MÚSCULO MASSETER DE CAMUNDONGOS.....	74
5.8 EFEITO ANTINOCICEPTIVO SINÉRGICO DO EUGENOL E DO CNQX NO MODELO DE NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA INJEÇÃO DE AMPA NO MÚSCULO MASSETER DE CAMUNDONGOS.....	74
5.9 EFEITO DO CNQX SOBRE A NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA INJEÇÃO DE CAINATO NO MÚSCULO MASSETER DE CAMUNDONGOS.....	76
5.10 EFEITO ANTINOCICEPTIVO SINÉRGICO DO EUGENOL E DO CNQX NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA INJEÇÃO DE CAINATO NO MÚSCULO MASSETER DE CAMUNDONGOS.....	76
5.11 EFEITO DO MCPG SOBRE A NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA INJEÇÃO DE TRANS-ACPD NO MÚSCULO MASSETER DE CAMUNDONGOS.....	78
5.12 EFEITO ANTINOCICEPTIVO SINÉRGICO DO EUGENOL E DO MCPG NO MODELO DE NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA INJEÇÃO DE TRANS-ACPD NO MÚSCULO MASSETER DE CAMUNDONGOS.....	78
5.13 EFEITO DA CAPSAZEPINA SOBRE A NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA INJEÇÃO DE CAPSAICINA NO MÚSCULO MASSETER DE CAMUNDONGOS.....	80
5.14 EFEITO ANTINOCICEPTIVO SINÉRGICO DO EUGENOL E DA CAPSAZEPINA NO MODELO DE NOCICEPÇÃO MUSCULAR OROFACIAL INDUZIDA PELA INJEÇÃO DE CAPSAICINA NO MÚSCULO MASSETER DE CAMUNDONGOS.....	80

5.15 EFEITO DA CÂNFORA SOBRE A NOCICEPÇÃO MUSCULAR OROFACIAL INDUZIDA PELA INJEÇÃO DE CINAMALDEÍDO NO MÚSCULO MASSETER DE CAMUNDONGOS.....	82
5.16 EFEITO ANTINOCICEPTIVO SINÉRGICO DO EUGENOL E DA CÂNFORA NO MODELO DE NOCICEPÇÃO MUSCULAR OROFACIAL INDUZIDA PELA INJEÇÃO DE CINAMALDEÍDO NO MÚSCULO MASSETER DE CAMUNDONGOS.....	82
5.17 EFEITO DO VERMELHO DE RUTÊNIO SOBRE A NOCICEPÇÃO MUSCULAR OROFACIAL INDUZIDA PELA INJEÇÃO DE MENTOL NO MÚSCULO MASSETER DE CAMUNDONGOS.....	84
5.18 EFEITO ANTINOCICEPTIVO SINÉRGICO DO EUGENOL E DO VERMELHO DE RUTÊNIO NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELO MENTOL INJETADO NO MUSCULO MASSETER DE CAMUNDONGOS.....	84
5.19 EFEITO DA AMILORIDA SOBRE A NOCICEPÇÃO MUSCULAR OROFACIAL INDUZIDA PELA INJEÇÃO DE SALINA ACIDIFICADA NO MÚSCULO MASSETER DE CAMUNDONGOS.....	86
5.20 EFEITO ANTINOCICEPTIVO SINÉRGICO DO EUGENOL E DA AMILORIDA NO MODELO DE NOCICEPÇÃO MUSCULAR OROFACIAL INDUZIDA PELA INJEÇÃO DE SALINA ACIDIFICADA NO MÚSCULO MASSETER DE CAMUNDONGOS	86
6 DISCUSSÃO.....	88
7 CONCLUSÕES.....	106
REFERÊNCIAS.....	107

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOR

A dor possui um papel fisiológico e funciona como um sinal de alerta para percebermos que algo está ameaçando a integridade física do nosso organismo (CHAPMAN; GAVRIN, 1999). A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) a definiu como “uma experiência emocional e sensorial desagradável, associada a uma lesão tecidual real, ou potencial, ou descrita em termos de tal lesão” (MERSKEY; BOGDUK, 1994). Assim sendo, a dor também envolve aspectos comportamentais, podendo causar reações emocionais negativas e, quando persistente, pode tornar-se debilitante e muitas vezes causadora de sofrimento, sendo frequentemente responsável pela diminuição drástica da qualidade de vida dos portadores deste sintoma (CHAPMAN; GAVRIN, 1999; GRIFFIS; COMPTON; DOERING, 2006; JULIUS; BASBAUM, 2001). A maioria dos modelos experimentais de dor em animais registram apenas o processo de codificação e processamento do estímulo nocivo (processo sensorial), sem levar em consideração os aspectos psicológicos que também influenciam na percepção final da dor (processo emocional), por esta razão, denominamos a resposta comportamental dos animais de nocicepção (LOESER; TREEDE, 2008).

Dentre as formas de classificação da dor, a mais habitualmente utilizada é a que leva em consideração o tempo de duração. Assim sendo, a dor pode ser classificada em aguda e crônica, entretanto, além da diferenciação temporal, neurobiologicamente esses dois tipos de dor também diferem profundamente. A dor aguda se dá pela ativação direta de nociceptores, estruturas especializadas na detecção de estímulos nocivos capazes ou não de causar alguma lesão. Desta forma, muitas vezes a dor aguda pode se estabelecer sem que ocorra uma lesão aparente. Quando a dor persiste por semanas ou meses, é classificada como dor crônica. A dor crônica muitas vezes permanece mesmo após a recuperação da lesão e caracteriza-se também pela incapacidade do organismo restabelecer suas funções fisiológicas. Na maioria dos casos de dor crônica, ocorrem várias alterações no organismo que facilitam a transmissão e manutenção dessa dor, como por exemplo o aumento da síntese e/ou liberação de neurotransmissores, alterações sinápticas e o brotamento de novas fibras nervosas (LOESER; MELZACK, 1999; MILLAN, 1999).

A dor pode também ser classificada quanto à sua origem. A dor

nociceptiva é aquela que ocorre devido a uma ativação excessiva de nociceptores, que são estruturas especializadas sensíveis a estímulos nocivos (mecânicos, térmicos e químicos) localizadas principalmente na pele, músculos e vísceras, enquanto que a dor *neurogênica* ocorre quando o tecido neuronal é lesionado com consequente liberação de neuropeptídeos que induzem à dor, tanto por estímulo periférico como central. A dor *neuropática* é aquela que ocorre após uma lesão ou disfunção do sistema nervoso somatosensorial. Ainda fazendo parte desta classificação, pode-se citar a dor *psicogênica* ou de origem psicológica, que é aquela que ocorre sem a presença de um fator somático identificável (MILLAN, 1999).

1.2 NOCICEPTORES

A dor é o resultado da ativação de estruturas sensoriais denominadas *nociceptores*. A palavra nociceptor deriva do latim (*nocere* = *ferir*), e por definição, estas estruturas especializadas funcionam como sensores de estímulos nocivos que se comportam como “vigilantes” de qualquer lesão tecidual que ocorra ou que possa ocorrer aos tecidos (LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001; MILLAN, 1999).

O primeiro pesquisador a propôr o conceito de nociceptor foi o fisiologista britânico Sherrington em 1908, que o definiu como uma entidade, um neurônio sensorial primário que seria ativado por um estímulo capaz de causar dano tecidual (JULIUS; BASBAUM, 2001; MCMAHON; KOLTZENBURG, 1990). Sugeriu ainda que para se diferenciarem das fibras nervosas sensoriais, os nociceptores seriam dotados de limiares ou sensibilidades específicas, ou seja, seriam ativados apenas por estímulos capazes de resultar em lesões teciduais, sendo insensíveis a estímulos não-nocivos, como por exemplo o tato. Décadas mais tarde, por meio de estudos eletrofisiológicos, outros pesquisadores demonstraram a existência de neurônios sensoriais primários que podem ser excitados por calor nocivo, pressão intensa ou irritantes químicos, mas não por estímulos inócuos, confirmando exatamente a teoria proposta por Sherrington (GREER; HOYT, 1990; JULIUS; BASBAUM, 2001).

Frente á ativação de um nociceptor, este irá conduzir a informação nociceptiva da pele, órgãos e demais tecidos dos membros e tronco para a medula espinal, e da cabeça e região cervical alta (C1 e C2) para o tronco encefálico (MESSLINGER, 1997; PACÁK; PALKOVITS, 2001) A maioria dos corpos celulares dos neurônios nociceptivos aferentes primários do nosso corpo estão localizados nos

gânglios da raiz dorsal (GRD), com exceção da região orofacial, que se localizam no gânglio trigeminal (GT) ou gânglio de Gasser (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2006). Os neurônios do GRD e do GT emitem projeções axonais em duas direções. Os neurônios do gânglio da raiz dorsal emitem projeções para a periferia através de seus prolongamentos periféricos, e para o corno dorsal da medula espinal através de seus prolongamentos centrais (BESSON, 1999; WALL; MELZACK, 1999). Da mesma forma, os neurônios do sistema trigeminal emitem seus prolongamentos para a periferia, entretanto seus prolongamentos centrais são emitidos diretamente para regiões do tronco encefálico, sem conexões com a medula espinal (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2006).

1.3 GLUTAMATO: UM MEDIADOR NOCICEPTIVO

Após a ativação de nociceptores por estímulos nocivos, várias substâncias podem ser liberadas localmente no tecido lesado. Essas substâncias são chamadas de mediadores inflamatórios ou mediadores nociceptivos, e podem ser liberadas por vários tipos celulares, como mastócitos, células endoteliais, plaquetas, células de Schwann, dentre outras (BESSON, 1999; BESSON; DICKENSON, 1997; EBERSBERGER et al., 1995).

Dentre os mediadores nociceptivos, destaca-se o aminoácido excitatório glutamato, sendo este extremamente importante por ser o neurotransmissor mais abundante do sistema nervoso central (SNC). O glutamato pode ser encontrado no encéfalo (incluindo estruturas ligadas à mediação da nocicepção), na medula espinal e periferia. Sua liberação ocorre em resposta a estímulos nociceptivos seguidos ou não de lesão tecidual (GRAHAM et al., 1967; MILLER et al., 1988; SLUKA; WILLIS, 1998). Embora se saiba há quase 80 anos que o glutamato exerce efeitos no SNC, somente em 1984 foi estabelecido que ele é um neurotransmissor (FONNUM, 1984). Até esse momento, eram-lhe atribuídas quase que exclusivamente funções metabólicas, principalmente pelo fato dele ter sido encontrado em vários compartimentos celulares no SNC, incluindo o citosol e a mitocôndria (KREBS, 1935).

A liberação de glutamato ocorre em diversas condições dolorosas (JULIUS; BASBAUM, 2001), sendo esta dependente do aumento dos níveis de Ca^{2+} intracelular (LAM et al., 2005). Uma vez liberado, atua nas sinapses podendo então interagir com receptores glutamatérgicos ionotrópicos (iGluRs) ou metabotrópicos (mGluRs), e desta forma promover diversos efeitos neurobiológicos. Os receptores

glutamatérgicos ionotrópicos constituem-se de canais iônicos e são classificados de acordo com critérios moleculares, eletrofisiológicos e farmacológicos, sendo denominados de acordo com o agonista pelo qual são seletivamente ativados. Desta forma, nessa classe de receptores estão incluídos aqueles seletivamente sensíveis ao NMDA (N-metil-D-aspartato), ao AMPA (ácido-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico) e ao cainato (ácido caínico) (FUNDYTUS, 2001).

Os receptores glutamatérgicos ionotrópicos AMPA e cainato, chamados também de receptores não-NMDA, têm uma maior afinidade pelos íons Na^+ , embora também sejam permeáveis aos íons Ca^{2+} e K^+ . Além disso, estes receptores medeiam potenciais pós-sinápticos excitatórios rápidos (TRUSSEL et al., 1988) e podem apresentar afinidade por diferentes agonistas (GASIC; HOLLEMANN, 1992). Os receptores AMPA podem coexistir com receptores NMDA em muitas sinapses no encéfalo, sendo estes responsáveis por mediar a maior parte da transmissão sináptica excitatória desta região. O efeito da ativação destes receptores em potenciais de membrana negativos é facilitar a entrada de íons Na^+ na célula e desta forma promover uma despolarização rápida e intensa.

Os canais ativados por NMDA também promovem excitação celular pela entrada de Na^+ , embora hajam duas diferenças importantes: os canais ativados por NMDA são ativados por Ca^{2+} e a corrente iônica de entrada é dependente de voltagem. Além disso, com a sua ativação, além da entrada de Ca^{2+} e Na^+ , ocorre também saída de íons K^+ . Quando o glutamato liga-se ao receptor NMDA, o poro abre-se normalmente, contudo, em potenciais normais de repouso, o canal permanece bloqueado por íons Mg^{2+} , o que impede a livre passagem de outros íons através do mesmo. Somente com a despolarização da membrana celular que o Mg^{2+} irá sair do poro, ocorrendo subsequentemente a ativação de canais AMPA na mesma sinapse ou sinapses vizinhas. Desta forma, as correntes iônicas de entrada através do canal NMDA são dependentes de voltagem, além de poderem ser ativadas por neurotransmissores (SALTER, 2005).

Os receptores glutamatérgicos metabotrópicos constituem uma classe de receptores acoplados a proteínas G, que diferem estrutural, farmacológica e funcionalmente dos receptores iGluRs. Podem ser divididos em três grandes grupos de acordo com suas propriedades farmacológicas ou via de sinalização que ativam. O grupo 1, que inclui as subunidades mGluR1 e mGluR5, possui como principal sinalização a ativação da fosfolipase C, uma enzima que catalisa a produção de inositol trifosfato que, por sua vez, promove a liberação de íons Ca^{2+} dos estoques intracelulares, que com níveis elevados irá contribuir para o

processo nociceptivo. O grupo 2, formado pelas subunidades mGluR2 e mGluR3, e o grupo 3, que inclui as subunidades mGluR4, mGluR6, mGluR7 e mGluR8, modulam a atividade da enzima adenilato ciclase com consequente aumento da produção do monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) (CONN; PIN, 1997; HAYASHI, 1985a). O mecanismo de ação nociceptiva dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos e metabotrópicos estão dispostos na figura 1.



Figura 1: Mecanismo de ação nociceptiva dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos e metabotrópicos.

Fonte: Adaptado de Conn; Pin, 1997.

LEGENDA: A liberação de glutamato na fenda sináptica pode ativar e promover a abertura de diferentes receptores glutamatérgicos ionotrópicos (NMDA, AMPA e cainato) com a consequente entrada de íons Na⁺ e Ca⁺ que irão contribuir para o processo nociceptivo. O glutamato pode também ativar diferentes classes de receptores metabotrópicos (mGluR), resultando em uma cascata de sinalização via proteína G com a consequente ativação das vias da PLC e/ou da AC que irão acarretar respectivamente o aumento da síntese do IP₃ e DAG ou do AMPc intracelular, eventos estes que irão contribuir para o processo nociceptivo. PLC (fosfolipase C); AC (adenilato ciclase); IP₃ (inositol trifosfato); AMPc (monofosfato cíclico de adenosina)

Muitos fármacos que atuam sobre os receptores glutamatérgicos têm mostrado eficácia em alguns estudos pré-clínicos e clínicos. Foi demonstrado que drogas antagonistas competitivas de receptores NMDA foram eficazes contra a dor muscular orofacial em humanos (LAM et al., 2005). Entretanto, devido aos seus efeitos colaterais, estes fármacos não chegaram a ser avaliados em grandes ensaios clínicos. Dentre os receptores glutamatérgicos ionotrópicos, o bloqueio dos receptores de cainato parece ser mais eficaz que o bloqueio dos receptores AMPA em produzir o efeito antinociceptivo. Todavia, em modelos de dor inflamatória, os antagonistas dos receptores AMPA são mais eficazes em comparação aos antagonistas de cainato. Dentre os receptores metabotrópicos, os antagonistas do mGluR1 são os que apresentam melhores resultados em modelos animais de dor (YOGESHWARI et al., 2009). O sistema glutamatérgico como um todo, está intrinsecamente ligado à detecção e transmissão de diferentes tipos de dor, dentre elas, a dor muscular orofacial (LAM et al., 2005), que será amplamente abordada neste trabalho.

1.4 OS CANAIS TRPS (TRANSIENT RECEPTORS POTENTIAL)

O maior grupo de detectores de estímulos nocivos pertence à família dos canais iônicos TRP (*transient receptor potential*), cujo nome é derivado de uma *Drosophila* mutante que apresenta uma resposta transiente ao invés de uma resposta sustentada ao brilho da luz (MONTELL; RUBIN, 1989). Sabe-se que estes canais possuem um papel fisiológico importante para algumas espécies, especialmente para a visão, olfato, paladar, mecanossensação, osmoregulação e termosensação (CLAPHAM, 2003). Entretanto, estudos realizados com a *Drosophila melanogaster* permitiram que estes canais fossem considerados como receptores “chave” na transdução sensorial.

Sua função especificamente na dor e termosensação, foi primeiramente sugerida pela descoberta de que os canais TRPV1 presentes em mamíferos são ativados por temperaturas elevadas e pela capsaicina, o princípio ativo da pimenta (CATERINA et al., 1997). Além disso, a clonagem e caracterização de outros canais similares ao TRPV1, os quais são ativados em limiares diferentes de temperaturas (Figura 2), estabeleceram uma regra geral de ligação dos canais TRPs à termosensação e nocicepção (CATERINA et al., 1999). Desta forma, estes canais iônicos, os quais essencialmente definem as características funcionais e propriedades dos nociceptores, são seletivamente ou

principalmente expressos nesses neurônios nociceptivos (CLAPHAM, 2003; DHAKA; VISWANATH; PATAPOUTIAN, 2006; JULIUS; BASBAUM, 2001). Apesar de conservarem apenas uma pequena cadeia de aminoácidos entre os diferentes receptores TRPs, estes compartilham uma arquitetura similar de seis domínios transmembrana com terminais carboxi e amino. Dentre um total de 28 canais, destacam-se os canais TRPV1-4, TRPA1 e TRPM8, que podem estar expressos em neurônios sensoriais e em queratinócitos da pele, e ser sensíveis e passíveis de serem ativados por estímulos térmicos (Figura 2). Além disso, outros canais TRPs são fortemente modulados por temperaturas médias (TRPM2, TRPM4 e TRPM5), entretanto, a falta de expressão destes canais em nociceptores sugere que eles não possuem envolvimento com a nocicepção (PATAPOUTIAN et al., 2009).

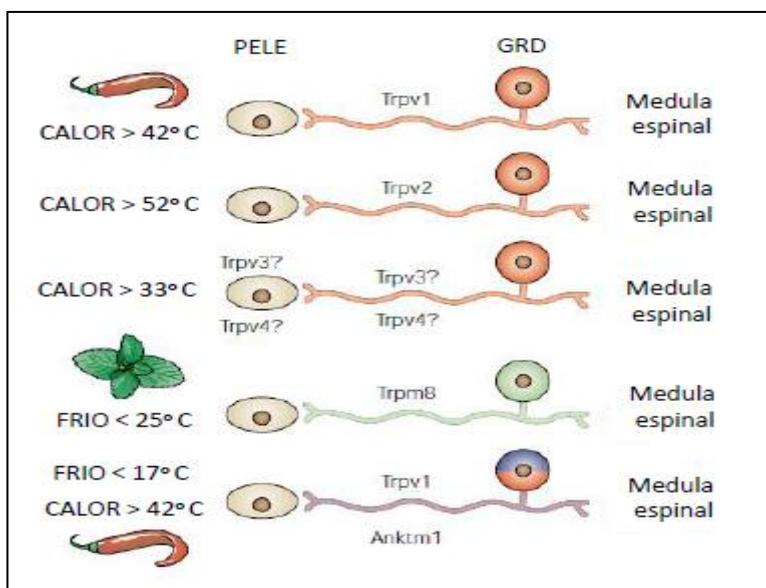


Figura 2: Temperaturas de ativação dos diferentes canais TRPs.

Fonte: Adaptado de Calixto et al., 2005.

LEGENDA: A figura mostra os corpos celulares e projeções periféricas de neurônios sensoriais. A expressão relevante dos canais ativados por temperaturas “mornas” como o TRPV3 e TRPV4 ainda não está clara. O último neurônio nesta figura ilustra um nociceptor polimodal. A expressão de *Anktm1* em um subconjunto de células sensíveis ao calor nocivo (TRPV1), indica que esta célula é capaz de responder a múltiplos tipos de estímulos dolorosos. GRD, gânglios da raiz dorsal

Considerando que uma estratégia alternativa para o desenvolvimento de novos analgésicos seria buscar alvos que estejam no início da via da dor e a importância dos receptores TRPV1, TRPA1 e TRPM8 na detecção e transdução dos estímulos térmicos, bem como seu envolvimento nos processos nociceptivos, acredita-se que possivelmente em um futuro próximo, novos analgésicos exerçam suas ações através desses alvos terapêuticos (CALIXTO et al., 2005; PATAPOUTIAN et al., 2005, 2009). A Tabela 1 demonstra um breve histórico dos canais TRPs.

Tabela 1: Histórico dos canais TRPs.

ANO	DESCOBERTA CIENTÍFICA
7000 A.C.	A pimenta é utilizada na culinária e medicina popular
1846	A capsaicina é isolado da Pimenta por W. Tresh
1919	Elucidação da estrutura química de capsaicina por Nelson
1949	Jancsó demonstra que a capsaicina produz dor e inflamação neurogênica
1977	Identificação do canal TRP por Drosophilos
1997	Clonagem do receptor vanilóide q (TRPV1)
1999	Clonagem do canal semelhante ao receptor vanilóide (TRPV2)
2000	Desenvolvimento de camundongos deficientes de TRPV1
2002	Clonagem de receptores TRPV3 e TRPV4
2002	Clonagem de TRPs sensíveis ao frio
2003	

Fonte: Adaptado de Calixto et al., 2005

1.4.1 Receptores TRPV1

O canal TRPV1 é descrito como um canal iônico que pode ser ativado pelo calor nocivo, pela capsaicina, e por pH ácido, o que o caracteriza como um transdutor nocivo polimodal (CATERINA et al., 1997; SIEMENS et al., 2006). Análises em camundongos deficientes de TRPV1 demonstraram que a capsaicina atua somente sobre esses receptores (CATERINA et al., 2000; DAVIS et al., 2000). As sensações de queimação e coceira são qualidades sensoriais frequentemente evocadas pela capsaicina, estando estas altamente relacionadas com a dor e por esta razão a grande maioria dos mamíferos evitam a capsaicina e outros compostos pungentes (GREEN; HAYES, 2004).

A capsazepina, um reconhecido antagonista dos receptores TRPV1, possui atividade contra a dor inflamatória. Este resultado

sugeriu a possível existência de alguma substância endógena similar a capsaicina que poderia causar dor através da abertura de canais TRPV1 (SANTOS; CALIXTO, 1997). De fato, estudos recentes têm mostrado que além do calor e prótons, algumas outras substâncias endógenas podem ativar o TRPV1. A primeira substância classificada como um endovanilóide foi o mediador lipídico anandamida (ZYGMUNT et al., 1999). Esta foi originalmente isolada do cérebro como um ligante endógeno do receptor canabinóide (DEVANE et al., 1992), e constituiu-se de um potente vasodilatador em preparações vasculares isoladas de artérias, efeito este que não foi revertido por antagonistas dos receptores canabinóides, mas que foi acompanhado pela liberação de CGRP (ZYGMUNT et al., 1999). Interessantemente, a capsazepina inibiu a vasodilatação induzida pela anandamida e a liberação de CGRP. A anandamida possui estrutura química semelhante à capsaicina, pois ambos os compostos possuem uma amida ligada à cadeia com lado alifático. Além desta, alguns compostos similares são ativadores de TRPV1, dentre os quais podemos citar a N-araquidonildopamina (endocannabinóide), a oleoiletanolamida (substância endógena que facilita a sensação de saciedade) e a N-oleodopamina (análogo endógeno da dopamina) (AHERN, 2003; CHU et al., 2003; HUANG et al., 2002; VAN DER STELT; DI MARZO, 2004).

Outros mediadores lipídicos também podem ativar o TRPV1. Vários produtos de lipooxigenases (LOXs) como o 12 e 15-HPETE (ácido hidroperoxieicosatetraenóico), 5 e 15-HETE (ácido hidroxieicosatetraenóico), e o leucotrieno B4 podem ativar diretamente o TRPV1 expresso homogênea ou heterogeneamente (HWANG et al., 2000), entretanto, as prostaglandinas e os ácidos graxos insaturados falham em ativar estes canais (SHIN et al., 2002).

Os mediadores não lipídicos endógenos como a bradicinina, o fator de crescimento neural (NGF) e a adenosina trifosfato (ATP) também são capazes de ativar os receptores TRPV1 (CHUANG et al., 2001; MORIYAMA et al., 2003). Nestes casos, este é geralmente ativado de forma indireta via receptores de bradicinina (B₂), de ATP (P2Y), de prostaglandina E2 (EP), de NGF (trkA) e por receptores glutamatérgicos metabotrópicos do gupo 5 (mGluR5). Estes receptores estão acoplados a proteínas G ou vias de tirosina quinases, e sua estimulação resulta na ativação da fosfolipase C (PLC) ou fosfolipase A2 (PLA2), da adenilil ciclase (AC), bem como da proteína quinase A e C. O canal TRPV1, a enzima PLC e o receptor trkA podem coexistir em um complexo funcional onde todos estão fisicamente associados. A PLC atua na membrana plasmática para catalizar a hidrólise do fosfatidil

inositol bifosfato (PIP₂), gerando diacilglicerol (DAG), e inositol trifosfato (IP₃). Com a hidrólise do PIP₂ pode ocorrer o aumento da atividade dos receptores TRPV1, o que sugere a participação da PLC na modulação destes canais (CHUANG et al., 2001).

Os canais TRPV1 podem ser encontrados em neurônios sensoriais de pequeno diâmetro, tanto periférica (pele, bexiga e córnea, polpa dentária) quanto centralmente (corno dorsal da medula espinal e subnúcleo caudal do complexo trigeminal espinal). Estes canais estão presentes em mais de 50% dos GRD e neurônios nociceptivos, sendo sua maior expressão em fibras peptidérgicas e não-peptidérgicas de pequeno e médio diâmetro (GIBBS MELNYK ; BASBAUM , 2011; GUO et al., 1999; TOMINAGA et al., 1998).

Estudos sugerem que as fibras peptidérgicas estão envolvidas no desenvolvimento da dor neurogênica e inflamatória, enquanto que as não peptidérgicas estão especialmente relacionadas ao estabelecimento da dor crônica (GUO et al., 1999; HUNT; MANTYH, 2001; TOMINAGA et al., 1998). Uma vez que ocorra a ativação dos receptores TRPV1, a célula se despolarizará havendo consequentemente um processo de nociceção neurogênica com a liberação de neuropeptídeos, degranulação de mastócitos e extravasamento plasmático (BIRKLEIN; SCHMELZ, 2008; SANTOS; CALIXTO, 1997). Interessantemente, repetidas aplicações de capsaicina podem ocasionar efeitos analgésicos, sendo estes, resultantes da dessensibilização regional via depleção de fibras C (CALIXTO et al., 2005), o que torna a utilização de preparações tópicas de capsaicina útil na redução de alguns quadros de dor (MASON et al., 2004). As evidências científicas aqui apresentadas sugerem uma provável participação do receptor TRPV1 na modulação de uma grande faixa de mecanismos nociceptivos, o que torna impressindível para a realização deste trabalho a avaliação do seu possível envolvimento na dor muscular orofacial.

1.4.2 Receptores TRPA1

O receptor TRPA1 é um sensor chave de dano químico *in vivo* e pode constituir de um importante alvo no tratamento de vários tipos de dor. Vários agentes químicos pungentes, excluindo a capsaicina, podem ativar o receptor TRPA1 (*transient receptor potential of ankyrin1*). Alguns destes compostos podem ser encontrados em alimentos como a raiz-forte e a mostarda (isotiocianatos), o cinamomo (cinamaldeído) e o alho (alicina) (BANDELL et al., 2004; BAUTISTA et al., 2005; JORDT

et al., 2004; MACPHERSON et al., 2005), entretanto, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio também podem ativar os canais TRPA1 (SAWADA et al., 2008). Sua ativação ocorre através de uma ligação covalente a grupamentos sulfidrila de resíduos de cisteína, portanto, a forma de modulação química dos receptores TRPA1 não é definida pela estrutura da molécula ativadora *per se*, mas sim em maior grau pela reatividade química. De fato, todos os potentes compostos reativos à cisteína testados parecem ativar o canal TRPA1 independentemente de sua forma estrutural (MACPHERSON et al., 2005). Outros ativadores de TRPA1 incluem a iodoacetamida, a acroleína, o formaldeído, o acetaldeído e a substância endógena 4-hidroxinonenal (4-HNE). Embora muitos destes compostos químicos se liguem à cisteínas de forma irreversível, foi demonstrado que a ligação do óleo de mostarda ao TRPA1 é reversível (BANG et al., 2007; MACPHERSON et al., 2005; TREVISANI et al., 2007).

Existem evidências consideráveis de que o mecanismo de ligação covalente da ativação do canal TRPA1 é fisiologicamente relevante. Estes compostos químicos reativos modificam proteínas de forma não-específica, sendo assim, a nocicepção causada por eles é dramaticamente reduzida ou totalmente eliminada em animais nocaute para o TRPA1 (MACPHERSON et al., 2005; TREVISANI et al., 2007). Além de alguns compostos químicos reativos, o TRPA1 também pode ser ativado em determinadas situações por temperaturas nocivas frias (SAWADA et al., 2008; STORY et al., 2003; ZURBORG et al., 2007;) e por cálcio (DOERNER et al., 2007), o que o permite ser considerado também como um nocisensor polimodal. Indiretamente pode ser ativado por cálcio que, com níveis elevados em neurônios nociceptivos, aumenta a possibilidade deste receptor atuar como um amplificador de outros sinais que elevam ainda mais os níveis de cálcio intracelular, incluindo os receptores TRPV1, no entanto, a função do cálcio sobre o canal TRPA1 é bastante complexa, pois este íon também causa a dessensibilização deste canal (AKOPIAN et al., 2000).

A maioria dos canais TRPs pode ser ativada ou ter a sua cascata intracelular modulada por neurotransmissores ou receptores de fatores de crescimento que irão estimular a via da fosfolipase C (CALIXTO et al., 2005). A aplicação de carbacol (agonista colinérgico misto) em células HEK293, que expressam receptores humanos de TRPA1 induziu grandes correntes de influxo de Ca^{2+} , que foram bloqueadas pelo vermelho de rutênio (JORDT et al., 2004). Foi demonstrado também que a bradicinina, um peptídeo que possui ação inflamatória e indutora de dor através do receptor metabotrópico B2, é capaz de ativar o TRPA1

(CALIXTO et al., 2005). Recentes estudos sugerem que a modulação dos canais TRP pode ser regulada por respostas consequentes à ativação das vias da PLC ou PLA2, incluindo a hidrólise do PIP2, a produção de metabólitos lipídicos, ou a liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares (CLAPHAM, 2003). De fato, células que expressam TRPA1 são sensíveis ao DAG, ácido araquidônico e Ca^{2+} intracelular (BANDELL et al., 2004), no entanto, camundongos com expressão reduzida dos canais TRPA1 apresentam déficits pronunciados na excitação de nociceptores por bradicinina, com reduzida sensibilidade à dor (BANDELL et al., 2004; BAUTISTA et al., 2006). Isto sugere que o TRPA1 pode funcionar como um importante receptor que medeia à dor e hiperalgesia induzidas por mediadores inflamatórios. Estudos recentes fornecem evidências de que a bradicinina, bem como outros receptores acoplados à proteína G, como receptores de proteases, aumentam as respostas de dor inflamatória por sensibilizar o TRPA1 através da ativação intracelular da PLC e da PKA (DAI et al., 2007; WANG et al., 2008). O AP18, um inibidor específico dos canais TRPA1, bloqueou a hiperalgesia mecânica induzida por CFA em camundongos do tipo selvagem porém, em animais deficientes de TRPA1, o mesmo inibidor não apresentou efeito. Assim, sugere-se que o TRPA1 é necessário para o desenvolvimento da hiperalgesia mecânica sob condições inflamatórias (PETRUS et al., 2007).

Os canais TRPA1 estão colocalizados com os canais TRPV1, pois observou-se a presença de neurônios sensíveis tanto ao frio nocivo quanto à capsaicina e ao calor no GRD, indicando assim a coexistência destes canais em um mesmo neurônio (STORY et al., 2003). Pode-se acrescentar ainda que, em neurônios altamente mielinizados o TRPA1 normalmente não é expresso. No entanto, em neurônios que contém os peptídeos SP e CGRP, esses canais também podem ser encontrados, o que sugere seu envolvimento na sensibilidade a estímulos nocivos em fibras A δ e C (STORY et al., 2003). Interessantemente, e de especial relevância para este trabalho, a expressão dos canais TRPA1 também pode ser observada no gânglio do nervo trigêmeo, entretanto, sua distribuição é maior no gânglio da raiz dorsal (56%), seguido do gânglio trigêmeo (36%) e em último no gânglio nodoso (28%) (NAGATA et al., 2005).

1.4.3 Receptores TRPM8

O canal TRPM8 (*transient receptor potential of melastatin 8*) possui uma sequência homóloga a outros canais do tipo TRP (TSAVALER et al., 2001), está normalmente expresso em terminais

periféricos e centrais de fibras sensoriais do tipo C e A δ presentes no GRD, GT e no GN, desempenhando um papel importante na modulação da transmissão sináptica (PREMKUMAR; AHERN, 2000; TSUZUKI et al., 2004).

Este grupo de receptores pode ser ativado por temperaturas frias inócuas e por compostos refrescantes como o mentol (MCKEMY; NEUHAUSSER; JULIUS, 2002; PEIER et al., 2002). Apesar destes estímulos ativadores de TRPM8 não serem nocivos, eles podem influenciar indiretamente a sinalização nociceptiva e contribuir para a alodinia ao frio nas dores inflamatória e neuropática. Animais nocaute para o receptor TRPM8 exibiram uma falta de sensibilidade ao frio (10 - 25°C) e reduzida sensibilidade à dor, entretanto, a dor induzida pelo frio em baixas temperaturas (~5°C) não promoveu alterações nestes animais (BAUTISTA et al., 2006). Até o presente momento, ainda não foi identificada a relação de ativadores específicos de alguns canais TRPs (TRPV2, TRPV3 e TRPV4) e sua participação nos processos nociceptivos (DHAKA; VISWANATH; PATAPOUTIAN, 2006).

O mentol é um monoterpeno que possui um cheiro e sabor característicos e que pode ser extraído de plantas e óleos essenciais, tais como a *Mentha genus*, o óleo de citronela e o de eucalipto, dentre outros (ECCLES, 1994). A ativação do receptor TRPM8 pelo mentol ou pelo frio não nocivo promove a formação de uma corrente iônica em neurônios sensoriais, funcionando este provavelmente como um sensor de temperatura (JANSSENS; VOETS, 2011). Demonstrou-se que temperaturas baixas ativam canais catiônicos não-seletivos em neurônios sensíveis ao frio (ativado em torno de 24°C) presentes no gânglio da raiz dorsal de ratos, e a sua atividade é fortemente aumentada pelo mentol (ativado em torno de 18°C) (REID; FLONTA, 2002). Além disso, estímulos frios induziram correntes iônicas para o meio intracelular promovendo o aumento da concentração do Ca²⁺ livre em uma subpopulação relativamente pequena de neurônios trigeminais. De forma consistente com a indução destas correntes iônicas pelo estímulo frio, o mentol parece induzir correntes semelhantes, sugerindo que esta substância também atua de forma direta nos canais TRPM8 (MCKEMY; NEUHAUSSER; JULIUS, 2002). Estas descobertas demonstram que o mentol e o frio ativam correntes com propriedades biofísicas muito semelhantes, sustentando a ideia da existência de um sítio molecular comum para a ativação de canais permeáveis ao Ca²⁺ no GRD e no GT de neurônios sensoriais. Embora a expressão do RNAm para o TRPM8 seja bastante alta nessas regiões, sua presença se restringe a 5-10 % das fibras C adultas de pequeno diâmetro presentes no gânglio da raiz dorsal

(PEIER et al., 2002). Foi demonstrado que o TRPM8 está expresso em aproximadamente metade dos neurônios sensoriais de ratos (OKAZAWA et al., 2004), no entanto, este receptor também pôde ser observado em uma subpopulação distinta de neurônios nociceptivos/termoceptivos caracterizados como sensíveis à dor e ao calor. Na verdade, culturas de neurônios trigeminiais de ratos possuem subpopulações distintas de neurônios sensíveis ao frio, e o TRPM8 possivelmente contribui para a transdução do frio em algum destes grupos (NEALEN et al., 2003).

O TRPM8 é preferencialmente expresso dentro de um grupo de neurônios sensíveis ao frio e que respondem rapidamente a um baixo limiar de ativação (em torno de 30°C). Uma classe distinta de neurônios sensíveis ao frio que respondem lentamente e que são ativados por temperaturas menores (em torno de 20°C), geralmente não possuem o RNAm do TRPM8 detectável (NEALEN et al., 2003). Recentemente, foi relatado que administração tópica de mentol (40%) em humanos induz sensações significativas de frio e de dor, além de hiperalgesia ao frio e aumento da perfusão cutânea (WASNER et al., 2004). Como a hiperalgesia é um sintoma frequente em pacientes com dor neuropática, fibras C periféricas sensibilizadas ao frio e que respondem ao mentol podem exercer uma importante função nesta condição (WASNER et al., 2004).

Com base no envolvimento dos receptores TRPM8 com os processos nociceptivos, pode-se sugerir o desenvolvimento de novos analgésicos que atuem sobre estes receptores que possuem potencialidade principalmente para o tratamento de alguns tipos particulares de condições dolorosas. Todavia, os mecanismos que envolvem o TRPM8 em modelos in vivo de dor são, infelizmente, pouco entendidos, especialmente porque nenhum antagonista seletivo ou animal nocaute está disponível até o presente momento.

1.5 RECEPTORES ASICs (CANAIS IÔNICOS SENSÍVEIS A ÁCIDO)

A base molecular dos canais sensíveis a prótons tem sido bastante estudada nos últimos anos, desde que correntes de cátions ativadas por prótons foram observadas em neurônios do GRD (BEVAN; YEATS, 1991; CATERINA; JULIUS, 2001). Foram identificados dois tipos principais de canais operados por prótons, os receptores TRPV1 e os ASICs (CATERINA; JULIUS, 2001; WALDMANN; LAZDUNSKI, 1998). Os receptores ASICs pertencem à família de canais de cátions voltagem-insensíveis, estão expressos tanto no sistema nervoso central

como no sistema nervoso periférico, e constituem-se de canais iônicos distribuídos ao longo da membrana celular, que são capazes de serem modulados (abertos) através da mudança de pH na região que os circunda (STEEN; REEH, 1993).

Atualmente, sabe-se que quatro genes são responsáveis por codificar 6 subunidades diferentes de ASICs, as quais foram clonadas em humanos: ASIC1a, ASIC1b, ASIC2a, ASIC2b, ASIC3 e ASIC4 (WEMMIE; PRICE; WELSH, 2006). Apesar de até o presente momento ainda não estar bem compreendida a função da subunidade ASIC4, sabe-se, entretanto, que ele não é modulado por correntes de prótons (AKOPIAN et al., 2000). Diferentes canais ASICs, heteroméricos e homoméricos, possuem distintas cinéticas, sensibilidade ao pH, seletividade a íons, distribuição tecidual e propriedades farmacológicas (HESSELAGER; TIMMERMANN; AHRING, 2004; WALDMANN et al., 1999). O único ativador conhecido de ASICs é o próton extracelular. Quando ativados, estes canais permitem preferencialmente a entrada de íons Na^+ , todavia, algumas subunidades podem também ser permeáveis ao Ca^{2+} , como por exemplo, o ASIC1a homomérico (WALDMANN et al., 1999).

Embora a composição exata das subunidades ou subtipos dos receptores ASICs na maioria dos neurônios ainda não esteja esclarecida, quase todas as subunidades conhecidas até o presente momento podem ser encontradas nos neurônios sensoriais primários (BENSON et al., 2002). Os receptores ASIC1a, ASIC1b, ASIC2b e ASIC3 estão densamente distribuídos em neurônios nociceptivos de pequeno e médio diâmetro (CHEN et al., 1998), enquanto que os ASIC2a e ASIC4 são mais expressos nos neurônios de médio e grande diâmetro (XIE et al., 2003). Sabe-se que no SNC, os ASIC1a, ASIC2a e ASIC2b estão bastante expressos no encéfalo (PRICE et al., 2001; WEMMIE; PRICE; WELSH, 2006), entretanto, a presença de outros ASICs no corno dorsal da medula espinal onde a sinalização é recebida e retransmitida ao encéfalo, ainda precisa ser melhor investigada (WU et al., 2004).

Existem poucos estudos sobre a distribuição dos canais ASICs na região orofacial, no entanto, Ichikawa e Sugimoto (2002) demonstraram através de estudos imunohistoquímicos, que aproximadamente 23% dos neurônios do gânglio trigeminal expressam os canais ASIC3. Além disso, verificaram que estes receptores estavam presentes também em neurônios de diferentes diâmetros, e não apenas nas fibras C não-mielinizadas.

Embora já se tenha o conhecimento de que o próton extracelular seja o único ativador conhecido dos receptores ASICs, existe um

crescente aumento de evidências de que, após serem abertos por prótons esses canais podem ser modulados por uma variedade de fatores. Sabe-se que a expressão de ASICs sofre um aumento após a lesão e inflamação tecidual (VOILLEY et al., 2001). Muitos mediadores inflamatórios tais como o NGF, a serotonina, a interleucina-1 e a bradicinina, promovem o aumento da expressão de ASICs tanto no SNC como no SNP (MAMET et al., 2002). Os ASICs podem também ser modulados por uma série de fatores que são gerados ou liberados durante a isquemia, inflamação e acidose, tais como o lactato, algumas proteases, o óxido nítrico e o ácido araquidônico (ALLEN; ATTWELL, 2002). Além disso, vários cátions (Zn^{2+} e Ca^{2+} , por exemplo) e proteínas quinases (PKA e PKC) podem modular alguns subtipos de canais ASICs (XIE et al., 2003).

A maioria dos subtipos de receptores ASICs é conhecida por gerar correntes transientes de entrada que induzem rapidamente uma dessensibilização (ALVAREZ DE LA ROSA et al., 2002). Sua ação pode ser modulada por uma variedade de substâncias químicas endógenas, que os permite detectar e responder à acidose que ocorre durante processos inflamatórios e outras condições patológicas (WEMMIE, PRICE; WELSH, 2006). O receptor ASIC mostrou-se como um potencial alvo terapêutico para o tratamento da dor quando a amilorida, um bloqueador não-seletivo destes canais, atenuou a nocicepção induzida pela infusão intradérmica de salina ácida em humanos (JONES et al., 2004). Injeções locais de amilorida ou seu derivado benzamil, significativamente reduziram os comportamentos nociceptivos induzidos pela serotonina, capsaicina ou formalina sob condições ácidas (ROCHA-GONZÁLEZ et al., 2009). Além disso, anti-inflamatórios não esteroidais, conhecidos por sua habilidade em inibir a síntese de prostaglandinas, aboliram o aumento da expressão destes receptores induzido pela inflamação (VOILLEY et al., 2001) e reduziram a dor induzida por salina acidificada (JONES et al., 2004).

A hipótese de que a principal função dos ASICs seja atuar como um sensor da dor promovida por ácido baseia-se na evidência de que esses canais estão expressos em neurônios sensoriais primários, e em vias nociceptivas espinais (corno dorsal da medula espinal, por exemplo). Os ASICs, homo ou heteroméricos, estão bem posicionados para detectar variações de pH tanto em faixas fisiológicas como patofisiológicas e sua inibição tem demonstrado reduzir a dor em uma variedade de condições dolorosas, tanto em modelos animais quanto em humanos (DUBÉ; ELAGOZ; MANGAT, 2009). O mecanismo de ação nociceptiva dos receptores TRPs e ASICs estão dispostos na Figura 3.

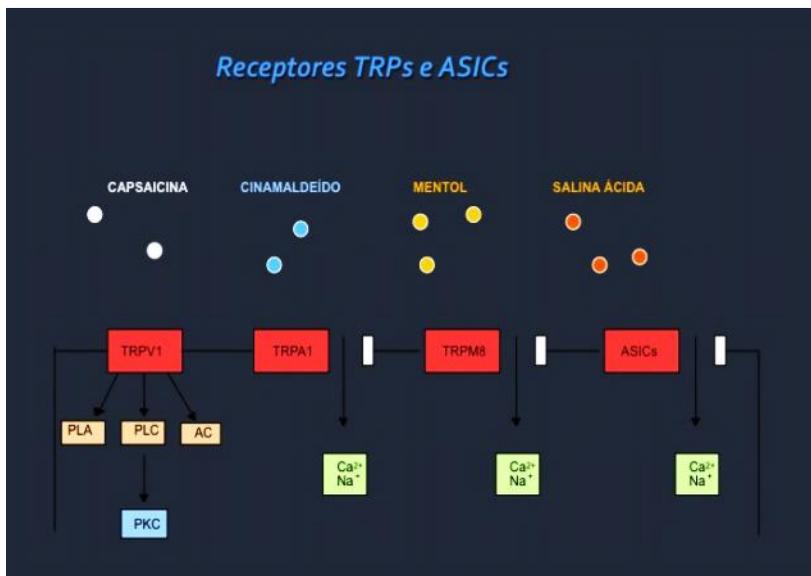


Figura 3: Mecanismo de ação nociceptiva dos receptores TRPs e ASICs.

Fonte: Adaptado de Bandell et al., 2004; Caterina et al., 1997; Peier et al., 2002; Xie et al., 2003.

LEGENDA:

A capsaicina promove a ativação dos receptores TRPV1 com a consequente ativação das vias da PLA, PLC (com a subsequente ativação da PKC) e AC que contribuem para o processo nociceptivo. O cinamaldeído, o mentol e a salina ácida irão ativar e promover respectivamente a abertura dos canais TRPA1, TRPM8 e ASICs, com a consequente entrada de íons Na^{+} e Ca^{2+} que irão contribuir para o processo nociceptivo. PLA (fosfolipase A); PLC (fosfolipase C); AC (adenilato ciclase); PKC (proteína quinase C); AMPc (monofosfato cíclico de adenosina)

Tendo em vista a reconhecida e considerável participação dos receptores glutamatérgicos, ASICs, e TRPs em diversos tipos de dor, e a existência de poucos estudos que os correlacionem com a nocicepção orofacial, torna-se necessária a avaliação do possível envolvimento destes receptores nas DTMs, mais especificamente nas de origem muscular, que por sua maior prevalência dentre os diversos tipos de dor e disfunção orofacial será a condição a ser abordada neste trabalho.

1.6 DISFUNÇÕES TEMPOROMANDIBULARES

1.6.1 Conceito

As Disfunções Temporomandibulares (DTMs) compreendem um grupo de distúrbios que podem acometer os músculos da mastigação e/ou as articulações temporomandibulares (ATMs) (STOHLER, 1995, 1999) e gerar dor, sendo este o sintoma mais frequentemente relatado pelos pacientes. Dores regionais e referidas nas regiões de cabeça, pescoço, face, dentes, orelha, e pré-auricular, bem como a presença de ruídos articulares e alterações neuromusculares, com possíveis alterações reflexas na limitação da abertura de boca e movimentos mandibulares, são sinais e sintomas frequentemente observados nos pacientes, estando intimamente relacionados a essas condições (KLASSER; GREENE, 2009; LASKIN, 1969).

Dentre a gama de distúrbios que podem afetar essas estruturas, torna-se importante salientar que as disfunções mais frequentemente observadas são as musculares e articulares, dentre as quais, as musculares são as mais prevalentes (DENUCCI; DIONNE; DUBNER, 1996; GYNTHNER et al., 1998).

1.6.2 Dados epidemiológicos

Estudos epidemiológicos têm demonstrado prevalências populacionais de até 59% de pacientes com algum sinal e/ou sintoma de DTM (CARLSSON; LERESCHE, 1995), sendo que destes, apenas 5% procuram por algum tipo de tratamento (MACFARLANE; GLENNY; WORTHINGTON, 2001; MACFARLANE et al., 2002). As DTMs são mais comuns em indivíduos na faixa etária entre 20 a 50 anos de idade (CARLSSON, 1999; MACFARLANE et al., 2002), havendo uma maior predileção pelo sexo feminino em relação ao masculino, provavelmente devido a fatores hormonais (BEVILACQUA-GROSSI et al., 2006; DE LEEUW, 2008; LERESCHE, 1997; LOCKER; SLADE, 1988). A dor persistente e recorrente tem um impacto potencial na vida cotidiana de seus portadores, principalmente a nível psicológico. Assim sendo, o desconforto, as limitações físicas e funcionais, associadas a fatores emocionais como o estresse e ansiedade, acarretam uma redução significativa na qualidade de vida dos portadores (DWORKIN; VON KORFF; LERESCHE, 1990; JOHN et al., 2007; TURP et al., 2007).

1.6.3 Etiologia das DTMs

Historicamente, a etiologia das DTMs tem sido associada principalmente a mecanismos relacionados com alterações na oclusão dentária ou estruturais, porém com considerável controvérsia e poucas evidências sólidas (BOEVER, 1973; CLARK, 1991; CLARK; SOLBERG; MONTEIRO, 1987; GREENE et al., 1998; TALLENTS, 1991; TALLENTS; STEIN; MOSS, 2000). Atualmente, sua etiologia é considerada multifatorial, ou seja, um ou mais fatores podem contribuir para a iniciação e/ou manutenção dos sinais e sintomas, dos quais destacam-se o bruxismo do sono e/ou em vigília (apertamento dental diurno), e distúrbios emocionais como o estresse e ansiedade (MCNEILL, 1997).

Apesar da influência dos fatores psicológicos e comportamentais sobre uma ampla gama de condições dolorosas já estar bem estabelecida, especialmente nas DTMs, assim como para outras formas de dor crônica (DWORKIN, 1991; DWORKIN; VON KORFF; LERESCHE, 1990,1992; OHRBACH; DWORKIN, 1998; SLADE et al., 2007), os fatores sensoriais também podem contribuir para sua etiologia (DIATCHENKO et al., 2006, 2007; SARLANI; GREENSPAN, 2003).

Embora os fatores causais das DTMs ainda sejam bastante discutidos, sabe-se que, neurobiologicamente, existem evidências de ganho da facilitação nociceptiva, incluindo mecanismos periféricos e centrais (FERNANDEZ-DE-LAS-PEÑAS et al., 2009). Recentemente, estudos experimentais em modelos animais têm reproduzido distúrbios sensoriais (hiperalgesia local e dor referida) e motores após a injeção de substâncias algógenas no músculo masseter de camundongos (CAPRA; DESSEM, 1992; LAM et al., 2004). Essas alterações foram semelhantes aquelas encontradas após a injeção de glutamato (CASTRILLON et al., 2008; SVENSSON et al., 2003) e salina hipertônica (SVENSSON et al., 2003) no músculo masseter de indivíduos voluntários assintomáticos.

1.6.4 Dor miofascial

A dor miofascial consiste de um complexo de sintomas sensoriais, motores e autonômicos que são ocasionados pela presença de pontos gatilho (PG) nos músculos mastigatórios. Os pontos gatilho ou *trigger points*, são regiões de extrema sensibilidade e hiperexcitabilidade que medeiam uma resposta local de contração das fibras musculares à palpação que, se suficientemente intensa, pode gerar dor regional ou em áreas distantes de seu local de origem, o que caracterizamos de *dor referida* (KELLGREN, 1938; MCNEILL, 1990;

OHRBACHE; DWORKIN, 1998; SIMONS, 1990). Nas DTMs, os músculos mastigatórios são as estruturas mais frequentemente afetadas, sendo que o músculo masseter representa um local frequente da presença desses pontos de gatilho, que podem gerar dor tanto local, como em outras regiões da cabeça e pescoço (ATM, orelha, olhos e região cervical da coluna espinal, por exemplo) (GYNTHER et al., 1998; SESSLE, 1999). Tendo em vista que os mecanismos histopatológicos, bioquímicos e eletrofisiológicos dos PG ainda não estão bem elucidados, inúmeros estudos têm sido realizados no intuito de demonstrar os melhores métodos de sua inativação e, por consequência, a redução ou eliminação da sensibilidade local e nos locais de referência da dor (ARIJI et al., 2010; CONTI et al., 2012; VENANCIO; ALENCAR ; ZAMPERINI , 2009).

Como descrito anteriormente, a presença de hábitos parafuncionais como o bruxismo do sono ou em vigília, podem constituir fatores etiológicos potenciais e determinantes para o aparecimento e/ou agravamento dos sinais e sintomas de dor e disfunção da musculatura mastigatória e articulação temporomandibular dos pacientes portadores de DTM (CARLSSON; LERESCHE, 1995). Inúmeras definições para essa parafunção têm sido utilizadas na literatura. A Academia Americana de Dor Orofacial, define o bruxismo como uma atividade parafuncional diurna ou noturna, que inclui os hábitos de apertar, moer, ou ranger os dentes (DE LEEUW, 2008). Mais recentemente, a Associação Americana de Desordens do Sono ressalta ocorrer, durante esse ato involuntário, um movimento de padrão desordenado do sistema mastigatório (SHINKAI et al., 2010). Estes sintomas podem ser consequência da hiperatividade muscular induzida pelo bruxismo, citada na literatura como um dos fatores causais mais comuns das DTMs, por contribuir com o ciclo dor-espasmo-dor (MANFREDINI; LOBBEZOO, 2010).

Justamente por sua etiologia ser de caráter multifatorial, o tratamento das DTMs necessita de uma abordagem multidisciplinar, podendo envolver tanto profissionais da odontologia como de outras áreas da saúde, como medicina, fonoaudiologia, psicologia, e fisioterapia. Para o manejo da dor muscular, principalmente durante as crises, fármacos como relaxantes musculares e anti-inflamatórios não-esteroidais são os mais utilizados, pois não causam dependência nem tolerância (PEREIRA, 2006), porém sua administração deve ser associada a outras modalidades terapêuticas para que se tenha um controle efetivo dos sintomas presentes.

Embora ainda não existam evidências científicas sólidas quanto às

técnicas mais eficazes no manejo da dor muscular orofacial, dentre as modalidades terapêuticas não farmacológicas mais estudadas atualmente destacam-se a utilização de dispositivos interoclusais (CONTI et al., 2012), a terapia manual (ARIJI et al., 2010), a laserterapia (PETRUCCI et al., 2011), a acupuntura (LA TOUCHE et al., 2010; SHEN et al., 2009; TURP, 2007), o agulhamento seco (FERNÁNDEZ-CARNERO et al., 2010; GODDARD et al., 2002; VENANCIO; ALENCAR ; ZAMPERINI , 2009), e a infiltração de substâncias como anestésicos locais (VENANCIO; ALENCAR ; ZAMPERINI , 2009) e morfina (HAN et al., 2007) e mais recentemente, a toxina botulínica (RAO et al., 2009), dentre outras técnicas que visam o bloqueio dos impulsos nociceptivos.

1.7 O NERVO TRIGÊMEO E O COMPLEXO SENSORIAL

O nervo trigêmeo (V par craniano) é um nervo misto, responsável pelas sensações da face e também por funções motoras como mastigar, morder e engolir. Este nervo emite 3 ramos principais que irão formar os nervos oftálmico (V1), maxilar (V2) e mandibular (V3). Todos estes ramos possuem funções sensoriais, sendo que o nervo mandibular possui também funções motoras (DANTAS, 2005). O nervo mandibular compreende a terceira e maior das três divisões do nervo trigêmeo que emergem do GT, possui uma raiz motora e uma sensitiva (nervo misto), sendo o seu maior componente a porção sensorial. A principal função da divisão motora do nervo trigêmeo é a inervação dos músculos da mastigação. Especificamente de interesse para este trabalho, a inervação sensorial do músculo masseter ocorre através do nervo massetérico, uma ramificação do nervo mandibular. Este, por sua vez, atravessa a parte posterior do processo coronóide da mandíbula e penetra na superfície profunda do músculo masseter, além de também fornecer inervação às ATMs.

Em humanos, os neurônios sensoriais do nervo trigêmeo possuem seus corpos celulares no gânglio trigeminal, localizado na superfície encefálica do osso temporal. As ramificações centrais dos neurônios sensoriais do gânglio trigeminal adentram o tronco encefálico ao nível da ponte, e projetam-se em redes complexas para o núcleo trigeminal sensorial principal e, principalmente, para o núcleo do trato espinal. Nestes locais ocorrem as sinapses com neurônios de segunda ordem, cujos prolongamentos irão formar o trato trigêmino-talâmico dando origem às vias ascendentes de condução da dor. Desta forma, as informações serão enviadas ao tálamo (núcleo ventral póstero-medial) e,

posteriormente, ao córtex somatosensorial primário onde a dor será percebida (FRIED, 2000; MESSLINGER, 1997).

Quanto às funções sensoriais do nervo trigêmeo, inicialmente é importante destacar que existem duas formas principais de sensação, o toque/posição e a dor/temperatura. Resumidamente, podemos falar que a informação sensorial de toque/posição é conduzida por fibras nervosas mielinizadas, de grande calibre e de alta velocidade de condução. Por outro lado, as sensações de dor e temperatura são em geral transmitidas por fibras desmielinizadas, de pequeno calibre e transmissão lenta. Essas informações são transmitidas por diferentes vias, porém ambas possuem em comum um neurônio sensorial que envia informações para núcleos sensoriais específicos no tálamo, que então enviará projeções a diferentes áreas do córtex cerebral (WAITE; ASHWELL, 2004).

1.7.1 Núcleos sensoriais do trigêmeo

O complexo nuclear trigeminal é uma longa coluna de células no tronco encefálico dorsolateral que se estende desde a porção rostral da ponte até a medula espinal, a nível do segundo segmento cervical (C2) (USUNOFF; MARANI; SCHOEN, 1997). Subdivide-se citoarquitectonicamente em núcleo mesencefálico, núcleo trigeminal sensorial principal e núcleo do trato espinal do nervo trigêmeo. A porção sensorial, especialmente importante para esse trabalho, é constituída pelos núcleos trigeminal sensorial principal, e o núcleo do trato espinal. Este, por sua vez subdivide-se em três subnúcleos: oral, interpolar e caudal (CAPRA; DESSEM, 1992; OLSZEWSKI, 1950; TEIXEIRA, 1990). Existem unidades nociceptivas nas porções superficiais e profundas ao longo de todo o componente sensorial do complexo nuclear trigeminal. O principal neurotransmissor e os receptores mais expressos nessas regiões são respectivamente, o glutamato e os receptores glutamatérgicos do tipo NMDA e não-NMDA (PETRALIA; YOKOTANI; WENTHOLD, 1994; TALLAKSEN-GREENE et al., 1992). Além disso, podem também ser encontrados peptídeos como a substância P (SP) e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), importantes neurotransmissores particularmente para aferentes primários de pequeno diâmetro que podem estar colocalizados com o glutamato (SESSLE, 1999).

Descobertas clínicas envolvendo a transecção do trato trigeminal são consistentes com os achados pré-clínicos em modelos experimentais animais, indicando que o subnúcleo caudal é o mais

importante componente do complexo nuclear trigeminal para a percepção do estímulo nocivo aplicado à região craniofacial (SESSLE, 1999). Por ser uma continuidade de medula espinal, este subnúcleo possui uma semelhança estrutural com a mesma, apresentando lâminas posteriores e anteriores (NAMBA; NISHIMOTO, 1988), sendo que as células da lâmina I dessa região respondem a estímulos nocivos mecânicos, térmicos e químicos de estruturas como a córnea, vasculatura cerebral, mucosa oral e nasal, dentes e ATMs (WAITE; ASHWELL, 2004).

1.7.2 Percepção da dor orofacial

As sensações de dor e temperatura originadas na face e cabeça seguem um caminho para o tálamo de maneira análoga ao trajeto espinal, que leva às sensações originárias de outras partes do corpo. As fibras de pequeno diâmetro do nervo trigeminal realizam a primeira sinapse com os neurônios sensoriais de segunda ordem geralmente no núcleo trigeminal espinal do tronco encefálico. Esta região recebe axônios de várias vias relacionadas à dor além da via trigeminal, como a via espinotalâmica e a via mesencefálica (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2006). Após as conexões no tronco encefálico, estas vias ascendem ao tálamo contralateral através do lemnisco trigeminal, sendo que grande parte delas são mais especializadas em transmitir sensações de queimação e dor agonizante (DANTAS, 2005).

1.7.3 Possíveis receptores envolvidos na dor muscular orofacial

Dez por cento da população dos Estados Unidos, em algum momento de sua vida sofre de dor crônica relacionada com os tecidos craniofaciais profundos, quer seja pela presença de alguma disfunção temporomandibular (DTM), fibromialgia, ou outras comorbidades (CARLSSON; LERESCHE, 1995). No caso das DTMs, aproximadamente 70% dos pacientes são mulheres em idade reprodutiva, com os sinais e sintomas característicos que incluem disfunção neuromuscular, dor na articulação temporomandibular e/ou em músculos mastigatórios, ruídos articulares e limitações nos movimentos mandibulares (KLASSER;

GREENE, 2009). Como já descrito anteriormente, os pacientes portadores de DTM frequentemente sofrem de alodínia e hiperalgesia, além de dores referidas que frequentemente confundem o diagnóstico clínico (CARLSSON; LERESCHE, 1995; MAIXNER et al., 1998; STOHLER 1995, 1999).

Os mecanismos nociceptivos envolvidos nos músculos craniofaciais e articulações temporomandibulares ainda não estão totalmente elucidados. Grande parte deste desconhecimento ocorre devido aos poucos estudos sobre os mecanismos centrais e periféricos deste tipo de dor, o que leva, conseqüentemente, a uma limitação no seu diagnóstico e tratamento. Desde meados dos anos 90, tem sido relatado que aminoácidos excitatórios e seus receptores poderiam estar envolvidos nos mecanismos periféricos das DTMs (YU et al., 1996; CAIRNS et al., 1998). Estudos clínicos demonstram que injeções intramusculares de glutamato na região orofacial promove dor (CAIRNS et al., 1998, 2003). Sabe-se também que receptores NMDA e não-NMDA, presentes em neurônios ganglionares do nervo trigeminal de ratos, uma vez ativados promovem a despolarização destes neurônios *in vitro* (PELKEY; MARSHALL, 1998; SAHARA et al., 1997). Desta forma, sugere-se uma função periférica do glutamato na dor muscular e articular orofacial (CAIRNS et al., 1998, 2001, 2002).

Possivelmente, em pacientes portadores de DTM, ocorra um aumento dos níveis periféricos de glutamato nos tecidos craniofaciais e facilitação da ativação dos receptores glutamatérgicos. A ativação destes receptores modifica a excitabilidade de fibras aferentes trigeminais e promove nocicepção. Assim sendo, traumas como o bruxismo, que tem como consequência a sobrecarga muscular e/ou articular (STOHLER, 1995), têm sido implicados na etiologia de certas DTMs, e é possível que durante essas disfunções ocorra a liberação de glutamato de neurônios afetados, assim como de macrófagos e células de Schwann (PARPURA et al., 1995; PIANI et al., 1991).

Além da capsaicina, que pode ativar e sensibilizar aferentes trigeminais (STRASSMAN; RAYMOND; BURSTEIN, 1996) e neurônios nociceptivos do tronco encefálico, o TRPV1 da região orofacial também pode ser ativado pela aplicação de calor nocivo ou prótons (CATERINA et al., 1997; DRAY, 1995; TOMINAGA et al., 1998). Estudos eletrofisiológicos identificaram fibras sensíveis à capsaicina na polpa dentária de gatos (IKEDA et al., 1997) e ratos (CHAUDHARY; MARTENSON ; BAUMANN , 2001). A capsaicina induziu um comportamento nociceptivo e estimulou a liberação de CGRP da polpa isolada de dentes de ratos (CHIDIAC et al., 2002;

FEHRENBACHER et al., 2009; GIBBS; HARGREAVES, 2008). Especificamente de interesse para o presente trabalho, foi demonstrado que o receptor TRPV1 está presente em aproximadamente 20 - 37,5% das fibras aferentes de pequeno a médio diâmetro do músculo masseter (RO et al., 2009; TAKEDA et al., 2005) o que sugere um possível envolvimento destes receptores na dor muscular orofacial. A injeção de capsaicina no músculo masseter induziu hipersensibilidade mecânica em ratos, o que sugere que os canais TRPV1 presentes nessa região são funcionais e comprova sua expressão nos neurônios aferentes da musculatura orofacial (RO et al., 2009). Quando injetada na articulação temporomandibular, a capsaicina induz um aumento de maneira dependente da dose da atividade muscular da mandíbula, com consequente sensibilização central de neurônios nociceptivos do tronco encefálico e produção de uma resposta inflamatória nos tecidos, que pode ser bloqueada pelos antagonistas dos receptores TRPV1 (HU et al., 2005). Além disso, a capsaicina pode induzir hiperalgesia secundária, alodínia e dor muscular no masseter com mudanças na função motora mandibular (GAZERANI; ANDERSEN; ARENDT-NIELSEN, 2005; WANG; ARENDT-NIELSEN; SVENSSON, 2002).

A injeção de óleo de mostarda, um potente agonista dos receptores TRPA1, no músculo masseter de ratos, induziu respostas nociceptivas e inflamatórias de forma dependente da dose (LEE et al., 2006) demonstrando o envolvimento deste canal na dor orofacial profunda. Estudos recentes confirmaram a expressão de RNAm para TRPV1 e TRPA1 em neurônios aferentes do músculo masseter presentes no GT de ratos. Os neurônios positivos para TRPA1 foram observados nas 3 divisões do GT, e a expressão deste receptor é observada principalmente em células de pequeno e médio diâmetro (RO et al., 2009).

A expressão do receptor TRPM8 pode ocorrer em mais de 10% dos neurônios trigeminais aferentes. Neurônios que expressam TRPM8 e neurônios aferentes primários estão mais distantes uns dos outros do que seria previsto pela associação aleatória, sugerindo que os canais TRPM8 parecem apresentar reduzida contribuição na ativação da circuitaria nociceptiva orofacial (HUANG et al., 2002).

1.8 EUGENOL: BIOLOGIA, QUÍMICA E USO COMERCIAL

O eugenol é um líquido oleoso ligeiramente solúvel em água e em solventes orgânicos, que constitui a maior parte do óleo do cravo-da-índia

(80 - 95 %) (*Syzygium aromaticum*, Myrtaceae). Possui a fórmula molecular $C_{10}H_{12}O_2$, é quimicamente classificado como um fenilpropano, sendo denominado de 2-metoxi-4-(2-propenil)-fenol (Figura 4). Na indústria farmacêutica, tanto o eugenol como o óleo do cravo-da-índia são utilizados para adicionar fragrância e aroma a produtos cosméticos (CHAIEB et al., 2007; PRAMOD; ANSARI; ALI, 2010).

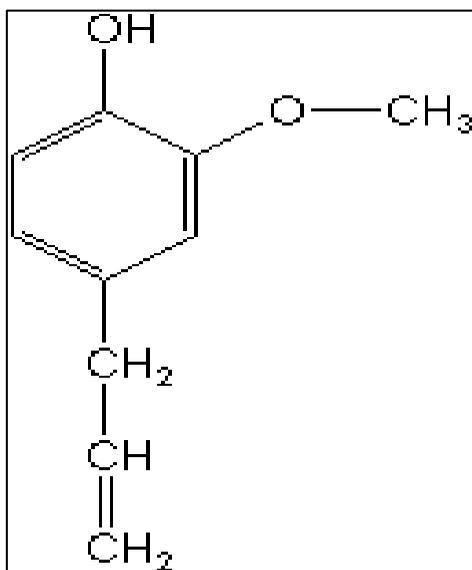


Figura 4: Estrutura química do eugenol.

Na odontologia o eugenol tem sido utilizado há décadas por seu reconhecido efeito analgésico (FRISCH; BHASKAR, 1968; KOZAM, 1977; OHKUBO; SHIBATA, 1997), fazendo parte da composição de materiais restauradores provisórios e cimentos obturadores de canal radicular, aliviando a dor proveniente de pulpites e hipersensibilidades dentinárias, efeitos estes mediados através das fibras A e C (EHRMANN; MESSER; ADAMS, 2003)

1.8.1 Efeitos biológicos e farmacológicos

Nos últimos anos, estudos têm pesquisado os efeitos farmacológicos do eugenol sobre os sistemas imunológico, reprodutivo, cardiovascular, gástrico, nervoso central, urinário, dentre outros (PRAKASH; GUPTA, 2005), demonstrando apresentar este composto,

atividades anti-inflamatória, anestésica, antioxidante, antimicrobiana, antifúngica e antiviral (CHAIIB et al., 2007). Dentre suas propriedades, seu efeito analgésico tem sido um dos mais atualmente estudados (CHUNG et al., 2008; LEE et al., 2005; PRAMOD; ANSARI; ALI, 2010; YANG et al., 2003). Uma das vantagens da utilização terapêutica do eugenol foi demonstrada por Fischer; Von Unruh ; Dengler (1990) que confirmaram uma rápida absorção e metabolização após sua administração oral em homens e mulheres saudáveis, sendo este quase que completamente (99%) excretado pela urina, 24 h após o tratamento.

Molecularmente, o eugenol exerce alterações bioquímicas que resultam em diversos efeitos biológicos. Os possíveis mecanismos pelo qual o eugenol exerce seus efeitos têm sido estudados (AOSHIMA; HAMAMOTO, 1999; YANG et al., 2003). Em neurônios aferentes primários de dentes de ratos, o mecanismo de ação analgésica e anestésica do eugenol parece depender em parte da inibição das correntes de canais de sódio dependentes de voltagem (PARK et al., 2006). Além disso, o eugenol inibiu correntes de canais de cálcio ativados por alta voltagem em neurônios aferentes primários dentários, sensíveis e não-sensíveis à capsaicina, o que pode contribuir para sua ação analgésica. No entanto, este efeito não foi bloqueado pela capsazepina, sugerindo que esta ação não se dá via bloqueio de receptores de potencial transiente do tipo TRPV1 (LEE et al., 2005). Por outro lado, outro estudo mostrou que este fenilpropano produz seus efeitos antinociceptivos em terminações nervosas sensoriais dos dentes através do bloqueio dos receptores TRPV1 (YANG et al., 2003). Além de ambos os neurônios, sensíveis e não-sensíveis à capsaicina, serem inibidos por eugenol, sua ação analgésica pode se dar também, em parte, pela inibição de correntes de canais de K^+ dependentes de voltagem (LI et al., 2007) e canais de cálcio do tipo $Ca_{v2.3}$ (CHUNG et al., 2008; PRAMOD; ANSARI; ALI, 2010).

Recentemente, Bachiega et al. (2012) avaliaram a atividade anti-inflamatória do óleo do cravo-da-índia e do eugenol em estudos *in vitro*, mensurando os níveis de citocinas pró-inflamatórias induzidas por LPS (lipopolissacarídeo) em macrófagos quando incubados com o óleo ou com eugenol. Os autores demonstraram que o óleo de cravo-da-índia reduziu os níveis de IL-1 β e IL-6, enquanto que o eugenol reduziu apenas o nível de IL-6 possivelmente através da supressão da via do NFK β , o que pode ajudar a explicar em parte seu efeito anti-inflamatório. Assim, sabendo-se que as citocinas pró-inflamatórias participam ativamente da indução e manutenção da dor na fase inflamatória no modelo da formalina e da dor neuropática, podemos

inferir que o efeito anti-inflamatório do eugenol pode ocorrer, pelo menos em parte, pela inibição da IL-6 ou também de outras citocinas pró-inflamatórias. Além da redução dos níveis de citocinas, ele é capaz de reduzir a atividade de enzimas responsáveis pela síntese de outros mediadores inflamatórios como, por exemplo, a óxido nítrico sintase, a lipoxigenase e a ciclooxigenase (PRAMOD; ANSARI; ALI, 2010). Demonstrou-se também que o eugenol pode potencializar a resposta ao GABA, capacidade esta que além de induzir analgesia, pode modular a ação de fármacos que atuam na transmissão neural, como os benzodiazepínicos ou barbitúricos (AOSHIMA; HAMAMOTO, 1999).

O eugenol também apresentou atividade farmacológica em modelos animais de dor neuropática. Sua administração via oral na dose de 40 mg/kg, foi capaz de reduzir significativamente a hipersensibilidade térmica induzida pela constrição do nervo ciático, sugerindo que o eugenol possa ter também uma interessante atividade em casos de dor neuropática (GUÉNETTE et al., 2007). Além disso, a injeção intratecal de eugenol em ratos reduziu a dor neuropática induzida pela ligação do nervo ciático, reduzindo tanto o comportamento de hiperalgesia, como o comportamento de alodínia (LIONNET; BEAUDRY; VACHON, 2010).

A avaliação da possível toxicidade do eugenol tem sido alvo de alguns estudos. Medeiros et al. (1996) demonstraram em experimentos *in vitro*, que o eugenol liga-se à resíduos de lisina e pode levar à inativação de proteínas que tenham este aminoácido na sua constituição e, assim, levar à toxicidade, sugerindo que esse efeito pode ocorrer em virtude de um efeito pró-oxidante. No entanto, esta toxicidade não foi encontrada *in vivo* nas mesmas doses utilizadas (PRAMOD; ANSARI; ALI, 2010). Além disto, foi demonstrado por Li et al. (2012) que a combinação da aspirina com o eugenol, equivalentes àquelas utilizadas clinicamente, não produziu uma significativa toxicidade em ratos, pois não alterou significativamente a atividade das enzimas hepáticas fosfatase alcalina e aminotransferase quando utilizadas em doses baixas e por um curto período de tempo. Ainda, quando avaliado em ambos os sexos, os roedores submetidos aos protocolos de toxicidade subcrônica também não apresentaram diferenças significativas entre os grupos. Com base nesses resultados, os autores sugerem que a combinação de aspirina e eugenol pode ser utilizada em doses menores que 50 mg/kg/dia, embora sejam necessários mais estudos com o intuito de investigar de forma mais detalhada sua toxicidade crônica. A toxicidade do extrato do cravo-da-índia e do eugenol também foi avaliada em um estudo sobre a viabilidade celular, onde macrófagos foram incubados

com o extrato do cravo-da-índia ou eugenol em concentrações de 5–100 µg/ml para avaliar a citotoxicidade pelo método de cristal violeta. Verificou-se que, tanto o extrato do cravo-da-índia como o eugenol, não afetaram a viabilidade celular destas células, sugerindo que estas substâncias possuem níveis seguros para a utilização terapêutica (BACHIEGA et al., 2012).

2 JUSTIFICATIVA

O presente trabalho justifica-se por cinco pontos principais:

- As DTMs musculares frequentemente acometem uma grande parte da população adulta, e muitos desses pacientes não respondem de maneira satisfatória e duradoura aos tratamentos atuais, o que sustenta a necessidade de pesquisas que investiguem novas abordagens terapêuticas nesta área (CARLSSON; LERESCHE, 1995; LAM et al., 2005; MAIXNER et al., 1998);
- O glutamato está comprovadamente envolvido na dor muscular orofacial; estudos têm demonstrado que este aminoácido excitatório promove descarga elétrica e medeia a dor nas fibras aferentes do músculo masseter, entretanto, ainda se faz necessária a pesquisa de quais receptores glutamatérgicos ionotrópicos e/ou metabotrópicos estariam envolvidos no processo nociceptivo muscular da região orofacial (CAIRNS et al., 2002; IVANUSIC et al., 2011);
- Embora ainda não se existam evidências científicas conclusivas quanto ao envolvimento dos canais TRPs na dor muscular orofacial, assim como para o sistema glutamatérgico, alguns autores sugerem a participação destes receptores, especialmente o TRPV1 (CAIRNS et al., 2002). Além disso, a expressão dos canais ASICs em aproximadamente 23% dos neurônios do gânglio trigeminal (CHIKAWA; SUGIMOTO, 2002) fortalecem a idéia de que estes receptores possam estar envolvidos nesse processo. Assim sendo, baseando-se na reconhecida participação destes receptores nos processos nociceptivos, torna-se necessária a pesquisa do possível envolvimento dos receptores TRPs (TRPV1, TRPA1, TRPM8) e ASICs na nocicepção muscular orofacial;
- O eugenol é uma substância utilizada há décadas na odontologia e apresenta várias propriedades farmacológicas, dentre elas a analgésica e anestésica, especificamente desejáveis para o controle da dor muscular orofacial (OHKUBO; SHIBATA, 1997; PRAMOD; ANSARI; ALI, 2010);

- As infiltrações de substâncias como anestésicos locais (VENANCIO; ALENCAR; ZAMPERINI , 2009) , morfina (HAN et al., 2007), e outras substâncias têm sido atualmente utilizadas com o intuito de controlar as crises de dor muscular orofacial, portanto, baseando-se nas suas reconhecidas propriedades analgésica e anestésica, o eugenol poderia constituir de uma nova alternativa de tratamento para os portadores de DTM muscular.

3 OBJETIVOS

Baseando-se nas evidências da literatura apresentadas, este trabalho possui os seguintes objetivos:

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o possível efeito antinociceptivo do eugenol em um modelo de DTM muscular em camundongos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Investigar o possível efeito antinociceptivo do eugenol em modelos de nocicepção periférica induzida pela injeção intraperitoneal (i.p.) de ácido acético e pela injeção intraplantar (i.pl.) de glutamato;
- 2) Avaliar o possível efeito antinociceptivo do eugenol em um modelo de nocicepção central induzida pela injeção intratecal (i.t.) de glutamato e dos agonistas seletivos dos receptores glutamatérgicos;
- 3) Avaliar o efeito antinociceptivo do eugenol no modelo de DTM muscular através da injeção de glutamato e agonistas dos receptores glutamatérgicos no músculo masséter de camundongos;
- 4) Investigar a participação dos receptores de potencial transientes do tipo TRPV1, TRPA1, TRPM8 e receptores ASICS, no efeito antinociceptivo do eugenol no modelo de dor muscular orofacial muscular em camundongos.

4 METODOLOGIA

4.1 ANIMAIS

Os experimentos foram conduzidos utilizando camundongos *Mus musculus* de ambos os sexos, da linhagem Swiss, distribuídos homogeneamente entre os grupos, pesando entre 25-35 g e provenientes do Biotério do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas), com livre acesso a ração e água antes dos experimentos. Além disso, ficavam alojados em caixas coletivas, contendo no máximo 20 camundongos cada, sendo os experimentos realizados sempre durante a fase clara do ciclo em sala silenciosa e com temperatura ambiente controlada. Todos os experimentos foram realizados somente após a aprovação do protocolo pela Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA) (protocolo PP00581, processo 81/CEUA/PRPE/2011) da UFSC e seguiram as diretrizes para o cuidado dos animais de laboratório e as normas éticas para investigação de dor experimental em animais conscientes (ZIMMERMANN, 1983). O número de animais e a intensidade dos estímulos utilizados foram os mínimos necessários para demonstrar de forma consistente o efeito dos tratamentos.

4.1 DROGAS E REAGENTES

Para a realização deste trabalho, as substâncias utilizadas foram o eugenol (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA), o glutamato (ácido hidrocloreídrico L-glutâmico), os agonistas glutamatérgicos NMDA (N-metil-D-aspartato), AMPA (ácido α -amino-3-hydroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico), cainato (ácido caínico) e trans-ACPD (ácido (\pm) -1-aminociclopentano-trans-1,3-dicarboxílico). Além disso, foram utilizadas os antagonistas dos receptores glutamatérgicos, MK-801 (antagonista dos receptores NMDA), MCPG ((\pm) - α -Metil-(4-carboxifenil) glicina, antagonista dos receptores glutamatérgicos metabotrópicos do grupo I e II), CNQX (antagonista dos receptores AMPA e cainato). Os agonistas dos receptores TRPs utilizados foram a capsaicina (agonista dos receptores TRPV1), o cinamaldeído (agonista dos receptores TRPA1) e o mentol (agonista dos receptores TRPM8), e

seus respectivos antagonistas foram a capsazepina (antagonista dos receptores TRPV1), a cânfora (antagonista dos receptores TRPA1) e o vermelho de rutênio (antagonista dos receptores TRPM8). Além disso também foram utilizadas a salina ácida pH 1,98 (agonista dos receptores ASICs), e a Amilorida (antagonista dos receptores ASICs). O glutamato, os agonistas e antagonistas dos receptores glutamatérgicos, bem como dos receptores TRPs foram provenientes da Tocris, Cookson Inc., Ellisville, USA. A tabela 2 dispõe de todas as drogas agonistas e antagonistas utilizadas, seus receptores alvo, bem como sua seletividade.

Tabela 2: Descrição da ação e seletividade das substâncias utilizadas nos experimentos.

RECEPTOR	AGONISTA	SELETIVIDADE	ANTAGONISTA	SELETIVIDADE
NMDA	NMDA	SELETIVO	MK-801	SELETIVO
AMPA	AMPA	SELETIVO	CNQX	NÃO-SELETIVO
CAINATO	CAINATO	SELETIVO	CNQX	NÃO-SELETIVO
MGLuR1,2	Trans-ACPD	NÃO SELETIVO	MCPG	NÃO-SELETIVO
TRPV1	Capsaicina	SELETIVO	Capsazepina	SELETIVO
TRPA1	Cinamaldeído	NÃO-SELETIVO	Cânfora	NÃO-SELETIVO
TRPM8	Mentol	NÃO-SELETIVO	Vermelho de Rutênio	NÃO SELETIVO
ASIC	Salina acidificada	NÃO-SELETIVO	Amilorida	NÃO-SELETIVO

4.2 AVALIAÇÃO DO POSSÍVEL EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO EUGENOL

Com o intuito de estender o conhecimento atual sobre as possíveis ações antinociceptivas do eugenol, inicialmente avaliamos seus efeitos em modelos clássicos de dor aguda em camundongos, especificamente sobre o sistema glutamatérgico (BEIRITH; SANTOS; CALIXTO, 2002; SANTOS et al., 2005). Estes experimentos foram importantes para que pudéssemos ter suporte para inicialmente padronizar um modelo de dor muscular orofacial induzida pelo glutamato em camundongos, e posteriormente avaliar a participação específica dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos e metabotrópicos, com o objetivo de verificar se o eugenol estaria exercendo efeito antinociceptivo de forma similar, todavia na região orofacial. Por fim,

assim como para o glutamato, um modelo de dor muscular orofacial induzido pelos agonistas dos receptores TRPV1 (capsaicina), TRPA1 (cinamaldeído), TRPM8 (mentol) e ASICs (salina acidificada) foi padronizado com o intuito de testar se o eugenol estaria exercendo seus efeitos antinociceptivos em parte, via esses canais iônicos.

4.3 AVALIAÇÕES COMPORTAMENTAIS

4.3.1 Efeito do eugenol sobre a nocicepção induzida por ácido acético injetado na região intraperitoneal de camundongos

A fim de investigar o efeito do eugenol em um modelo de nocicepção induzida por ácido acético i.p., inicialmente, os camundongos foram pré-tratados com o eugenol por via oral (30-300 mg/kg, v.o.) por meio de gavagem ou por via intraperitoneal (30-100 mg/kg, i.p.) por meio de uma seringa, respectivamente 60 ou 30 minutos antes da injeção deste alógeno. Os animais do grupo controle receberam um volume similar de veículo (10 mL/kg, v.o. ou i.p.). A injeção intraperitoneal (i.p.) de ácido acético (0,6%, 0,45 mL) foi realizada de acordo com os protocolos descritos por Santos et al., (2005) com a finalidade de induzir a contração do músculo abdominal juntamente com o alongamento dos membros traseiros, em resposta à injeção, sendo esta reação indicativa de nocicepção. Após as injeções de ácido acético, os camundongos foram colocados individualmente em cilindros de vidro de 20 cm de diâmetro, e as contorções abdominais foram contadas cumulativamente ao longo de um período de 20 min (SANTOS et al., 2005).

4.3.2 Efeito do eugenol sobre a nocicepção induzida pelo glutamato injetado na pata de camundongos

Na tentativa de fornecer evidências sobre a possível interação do eugenol com o sistema glutamatérgico, investigamos se o eugenol seria capaz de antagonizar a nocicepção periférica induzida pela injeção intraplantar (i.pl.) de glutamato na pata traseira de camundongos. Os procedimentos foram realizados de acordo com o modelo descrito anteriormente por Beirith; Santos; Calixto (2002). Desta forma, um

volume de 20 μL de glutamato (20 $\mu\text{mol/pata}$) foi injetado na superfície ventral da pata traseira direita dos camundongos. Em seguida, os camundongos foram observados individualmente durante 15 minutos, e a quantidade de tempo gasto lambendo a pata injetada foi considerado como um comportamento indicativo de nocicepção (RIBAS et al., 2008; MEOTTI; COELHO; SANTOS, 2010).

4.3.3 Efeito do eugenol sobre a nocicepção induzida pela injeção intratecal de glutamato e agonistas dos receptores glutamatérgicos

A ação do eugenol sobre o sistema glutamatérgico foi avaliada através da administração pela via intratecal de agonistas dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos e metabotrópicos. Para tanto, os animais receberam veículo (10 mL/kg, i.p.) ou eugenol (10 mg/kg, i.p.) 30 min antes da injeção intratecal de 5 μL de cada droga. As injeções foram realizadas com os camundongos completamente conscientes, utilizando o método descrito por Hylden e Wilcox (1980). Assim sendo, os animais foram contidos manualmente, e uma agulha de calibre 30 conectada a uma microseringa de 25 μL foi inserida através da pele e entre as vértebras para o espaço subdural entre os segmentos espinais L5-L6 e as substâncias foram injetadas durante um período de 5s. Este procedimento resulta em movimento único da cabeça dirigida aos flancos ou membros traseiros, e o contacto do focinho do animal com o órgão alvo. A quantidade de tempo (segundos) que o animal dispense lambendo ou mordendo a região caudal foi tomada como evidência de nocicepção e avaliada após as injeções dos seguintes agonistas: glutamato (175 nmol/sítio, 3 min), trans-ACPD (50 nmol/sítio, 15 min), NMDA (450 pmol/sítio, 5 min), cainato (110 pmol/sítio, 4 min), e AMPA (135 pmol/sítio, 1 min) (GADOTTI et al., 2006; HYLDEN; WILCOX, 1980).

4.3.4 Modelo de nocicepção muscular orofacial

Atualmente numerosos estudos em modelos animais e em humanos têm sido realizados com o intuito de reproduzir os sintomas de dor apresentado pelos pacientes portadores de DTM muscular (CAPRA; RO, 2004; RO; CAPRA, 2006). A metodologia utilizada para induzir a

dor muscular orofacial em camundongos neste trabalho foi adaptada de uma publicação que padronizou este modelo em ratos (RO; SVENSSON; CAPRA, 2002). Neste estudo, os autores injetaram óleo de mostarda no músculo masseter de ratos levemente anestesiados e observaram um comportamento vigoroso, consistente e assimétrico de agitação da pata no lado ipsilateral à injeção, considerado como um comportamento nociceptivo apresentado pelos animais. Outro trabalho importante para a padronização deste modelo em camundongos foi publicado por Shimada e LaMotte (2008), que demonstraram as diferenças entre os comportamentos de nociceção (wiping, onde o animal utiliza o membro anterior ipsilateralmente no local da injeção), autolimpeza (grooming, onde o animal utiliza os dois membros anteriores) e o comportamento de coçar (scratching, onde o animal utiliza o membro posterior).

As doses iniciais utilizadas para a realização da curva dose resposta de cada agonista e antagonista foram determinadas através de trabalhos prévios ou de experimentos pilotos. Desta forma, a padronização foi realizada inicialmente utilizando-se diferentes doses de glutamato (0,2 – 4 nmol/sítio), bem como dos agonistas seletivos para os receptores glutamatérgicos NMDA (5 – 100 nmol/sítio, agonista do receptor glutamatérgico ionotrópico NMDA), AMPA (0,1 – 10 nmol/sítio, agonista do receptor glutamatérgico ionotrópico AMPA), cainato (1 – 10 nmol/sítio, agonista do receptor glutamatérgico ionotrópico cainato), e Trans-ACPD (5 – 200 nmol/sítio, agonista dos receptores glutamatérgicos metabotrópicos do grupo I e II). Além disso, foram utilizadas também diferentes doses dos agonistas dos diferentes receptores TRP, capsaicina (0,1 – 10 nmol/sítio, agonista TRPV1), cinamaldeído (10 – 100 nmol/sítio, agonista TRPA1), mentol (1 – 10 nmol/sítio, agonista TRPM8) bem como da salina acidificada pH1,98/sítio, agonista dos receptores ASICs). As administrações foram realizadas com os animais levemente anestesiados por inalação de isoflurano a 2%, quando então os animais receberam uma única injeção (5µL/sítio) de um dos agonistas testados no corpo do músculo masseter direito, mediante a utilização de uma agulha (30 G) adaptada a uma microseringa de 25 µL de Hamilton. As infusões foram realizadas lentamente, durante um tempo de 10 segundos para descartar a possibilidade da nociceção ser induzida pela injeção e não pelo agonista injetado. Logo após as injeções, o tempo (em segundos) que o animal dispndia realizando o comportamento nociceptivo (wiping) com a pata dianteira ipsilateralmente ao lado das injeções foi avaliado de forma cumulativa, sendo este valor utilizado como indicativo de

nociceção. Para cada substância álgica foi realizada uma avaliação do decurso temporal para determinar o intervalo de tempo no qual as observações comportamentais seriam realizadas. Para a certificação de que a injeção por si só não induziria comportamento nociceptivo, o veículo (solução salina, 10 μL /sítio) foi administrado no grupo controle.

4.3.5 Efeito dos antagonistas dos receptores glutamatérgicos, TRPs e salina acidificada frente à nociceção muscular orofacial induzida pelos seus respectivos agonistas

Inicialmente foi realizada uma curva dose resposta para os diferentes antagonistas dos receptores glutamatérgicos, TRPs e ASICs, frente a injeção da dose (previamente determinada) dos agonistas destes receptores que foi capaz de induzir significativamente a resposta nociceptiva de wipping nos camundongos. Para tanto, os antagonistas glutamatérgicos MK-801 (10 – 50 nmol/sítio, antagonista do receptor NMDA), CNQX (1 – 10 nmol/sítio, antagonista dos receptores AMPA e cainato) e MCPG (0,01 pmol – 1000 pmol/sítio, antagonista dos receptores metabotrópicos do grupo I e II) foram coadministrados (5 μL /sítio) com os seus respectivos agonistas NMDA (100 nmol/sítio), AMPA (10 nmol/sítio), cainato (10 nmol/sítio) ou Trans-ACPD (100 nmol/sítio) em uma única injeção, totalizando um volume de 10 μL injetado no músculo masseter direito dos camundongos. Assim como para os antagonistas dos receptores glutamatérgicos, foi também realizada uma curva dose resposta para os antagonistas dos receptores TRPs e ASICs. Para testar os receptores TRPs, foram utilizados os antagonistas capzasepina (20 – 200 nmol/sítio, 5 μL , antagonista dos receptores TRPV1), cânfora (10 – 100 nmol/sítio, 5 μL , antagonista dos receptores TRPA1), ou vermelho de rutênio (0,1 – 10 nmol/sítio, 5 μL , antagonista dos receptores TRPM8) coadministrados (5 μL /sítio) com os seus respectivos agonistas capsaicina (10 nmol/sítio, 5 μL) cinamaldeído (100 nmol/sítio, 5 μL) ou mentol (10 nmol/sítio, 5 μL), em uma única injeção, totalizando um volume de 10 μL injetado no músculo masseter direito dos camundongos. Para a determinação da curva resposta para o antagonista dos receptores ASICs, foi realizada a coinjeção de amilorida (3 - 30 nmol/sítio, 5 μL , antagonista dos receptores ASICs) com salina acidificada (pH 1,98/sítio, 5 μL). Para todas as avaliações, o tempo (em segundos) que o animal dispendeu realizando o comportamento nociceptivo de wipping com a pata dianteira ipsilateralmente ao lado das

injeções, foi utilizado como indicativo de nocicepção. Os grupos controles receberam apenas veículo no mesmo volume (10 µL/sítio).

4.3.6 Avaliação do efeito antinociceptivo do eugenol sobre a nocicepção muscular orofacial induzida pelo glutamato e pelos agonistas dos receptores glutamatérgicos, TRPs e ASICs

Nesta etapa, o efeito antinociceptivo do eugenol frente a nocicepção muscular orofacial induzida por glutamato (2 nmol/sítio, 5 µL), NMDA (100 nmol/sítio, 5 µL), AMPA (10 nmol/sítio, 5 µL), cainato (10 nmol/sítio, 5 µL) ou Trans-ACPD (100 nmol/sítio, 5 µL) foi investigado. Deste modo, inicialmente foi avaliado o efeito do eugenol quando administrado pela via oral 1 h antes (3 – 100 mg/kg) da indução da nocicepção pela injeção intramuscular de glutamato no masseter de camundongos. Os grupos controle receberam apenas solução salina (10 ml/kg, v.o.) utilizada como veículo.

Em outro grupo experimental, o possível efeito local (periférico) do eugenol também foi investigado na nocicepção muscular orofacial induzida pelo glutamato, NMDA, AMPA, cainato ou Trans-ACPD. Para tanto, o eugenol foi coadministrado nas doses de (0,1 - 30 µg/sítio, 5 µL) com glutamato (2 nmol/sítio, 5 µL), NMDA (100 nmol/sítio, 5 µL), AMPA (10 nmol/sítio, 5 µL), cainato (10 nmol/sítio, 5 µL) ou Trans-ACPD (100 nmol/sítio, 5 µL), no masseter direito dos camundongos e o comportamento de wiping novamente foi considerado como indicativo de nocicepção. Os grupos controle receberam apenas solução salina como veículo (10 µL/sítio).

Em seguida, investigou-se o possível efeito local do eugenol contra a nocicepção muscular orofacial induzida pela capsaicina (10 nmol/sítio, 5 µL), cinamaldeído (100 nmol/sítio, 5 µL), mentol (10 nmol/sítio, 5 µL) ou salina acidificada (pH 1,98/sítio, 5 µL) conforme metodologia descrita anteriormente.

4.3.7 Avaliação do possível efeito sinérgico do eugenol com os antagonistas glutamatérgicos e TRPs na nocicepção muscular orofacial induzida por seus respectivos agonistas

Para avaliar o possível efeito sinérgico do eugenol com os antagonistas glutamatérgicos (MK-801, CNQX e MCPG), antagonistas dos receptores TRPs (capsazepina, cânfora e vermelho de rutenio) e

antagonista dos receptores ASICs (amilorida), doses subativas (determinadas nos protocolos anteriores) do eugenol e destes antagonistas glutamatérgicos foram coadministradas juntamente com seus respectivos agonistas. O volume final injetado no músculo masseter direito de cada animal foi de 15 μL /sítio, sendo 5 μL /sítio de cada substância administrada. Os grupos controles receberam apenas veículo no mesmo volume (15 μL /sítio).

4.3.8 Análise estatística

Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM), exceto os valores de DI50 (doses de extrato, frações e compostos isolados que reduziram as respostas nociceptivas em 50% em relação ao grupo controle), as quais estão apresentadas como médias geométricas acompanhadas de seus respectivos limites de confiança em nível de 95%. Os valores de DI50 foram obtidos através do método de regressão não-linear utilizando-se o software Graph Pad Prism (2005, San Diego, CA) versão 4.03. A significância estatística dos diferentes grupos foi determinada por ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Newman-Keuls. Em todos os casos, foi considerada diferença significativa quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 EFEITO DO EUGENOL SOBRE A NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA INJEÇÃO INTRAPERITONEAL DE ÁCIDO ACÉTICO EM CAMUNDONGOS

Os resultados apresentados na Figura 5 demonstram que o pré-tratamento com eugenol (30-300 mg/kg), administrado v.o. (60 min) ou i.p. (30 min) antes da injeção de ácido acético, produziu uma inibição acentuada e dependente da dose das constorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos, com valores de DI_{50} de 51,3 (23,5-111,9) e 50,2 (38,4-65,6) mg/kg e inibições de $82 \pm 10\%$ e $90 \pm 6\%$ para os tratamentos v.o. e i.p. , respectivamente.

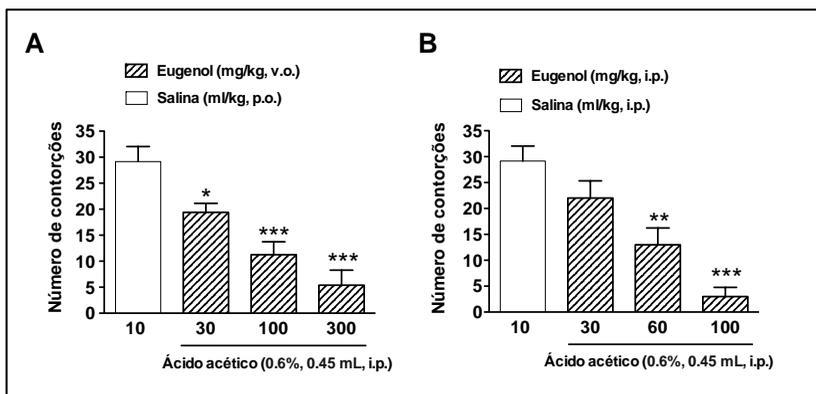


Figura 5: Efeito antinociceptivo do eugenol administrado pelas vias oral (30-300 mg/kg, painel A) e intraperitoneal (30-100 mg/kg, painel B) sobre a nocicepção induzida por ácido acético em camundongos.

LEGENDA: Cada coluna representa a média de 5-8 animais, e as linhas verticais indicam o EPM (erro padrão da média). Asteriscos denotam diferenças significativas comparado com o grupo controle (salina). (ANOVA de uma via seguido do teste de Newman-Keuls; * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$ *** $P < 0,001$).

5.2 EFEITO DO EUGENOL SOBRE A NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA INJEÇÃO INTRAPLANTAR DE GLUTAMATO EM CAMUNDONGOS

A administração i.p. de eugenol (0,3-100 mg/kg) atenuou significativamente e de maneira dependente da dose a nocicepção induzida pela injeção i.pl. de glutamato (20 μ mol/pata) em camundongos. Os valores da DI_{50} e da inibição foram respectivamente de 5,6 (1,5-20,4) mg/kg e $62 \pm 5\%$ (Figura 6).

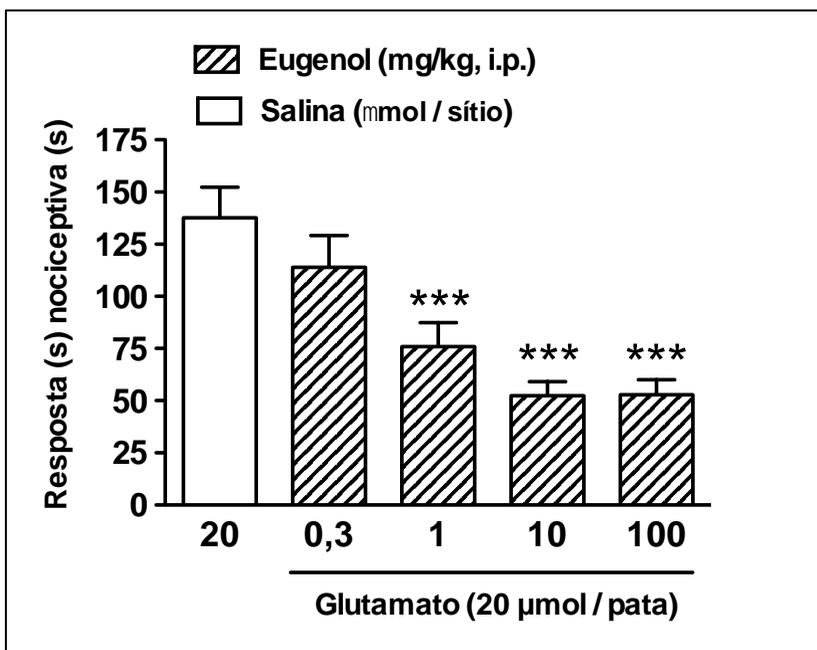


Figura 6: Efeito antinociceptivo do eugenol administrado pela via intraperitoneal (0,3-100 mg/kg) sobre a nocicepção induzida por glutamato (20 μ mol/ pata) em camundongos. A solução salina foi utilizada como controle (10 ml/kg, i.p.).

LEGENDA: Cada coluna representa a média de 5-8 animais, e as linhas verticais indicam o EPM (erro padrão da média). Asteriscos denotam diferenças significativas comparado com o grupo controle (salina). (ANOVA de uma via seguido do teste de Newman-Keuls; *** $P < 0,001$).

5.3 EFEITO DO EUGENOL SOBRE A NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA INJEÇÃO INTRATECAL DE GLUTAMATO E AGONISTAS DOS RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS EM CAMUNDONGOS

Os resultados apresentados na Figura 7 mostram que o eugenol quando administrado pela via i.p. (10 mg/kg) produziu redução significativa da resposta nociceptiva induzida pela injeção intratecal (i.t.) de glutamato, AMPA e cainato com valores de inibições de 37 ± 9 , 41 ± 12 , $55\pm 5\%$, respectivamente. No entanto, o mesmo tratamento dos animais com eugenol não foi capaz de alterar a resposta nociceptiva induzida por NMDA ou trans-ACPD.

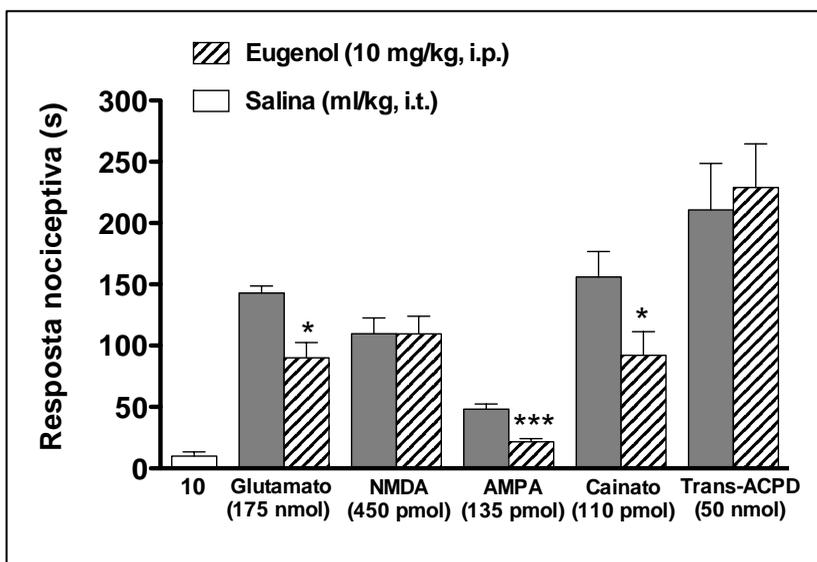


Figura 7: Efeito antinociceptivo do eugenol administrado pela via intraperitoneal (10 mg/kg, i.p.) no comportamento nociceptivo induzido pela injeção intratecal de glutamato, NMDA (450 pmol), AMPA (135 pmol), cainato (110 pmol) e trans-ACPD (50 nmol) em camundongos.

LEGENDA: Cada coluna representa a média de 5-8 animais, e as linhas verticais indicam o EPM (erro padrão da média). Asteriscos denotam diferenças significativas comparado com o grupo controle (10 ml/kg, i.p.). (ANOVA de uma via seguido do teste de Newman-Keuls; * $P < 0,05$ *** $P < 0,001$).

5.4 EFEITO DO EUGENOL SOBRE A NOCICEPÇÃO MUSCULAR OROFACIAL INDUZIDA PELA INJEÇÃO DE GLUTAMATO NO MÚSCULO MASSETER DE CAMUNDONGOS

Os dados apresentados na Figura 8A mostram que o glutamato (1 – 4 nmol/sítio, i.m.) quando injetado no músculo masséter de camundongos foi capaz de induzir uma resposta nociceptiva dependente da dose, caracterizado pelo comportamento de wipping, sendo esta resposta significativamente diferente do grupo que recebeu somente a solução salina. Da mesma forma, podemos observar que o eugenol quando administrado pela via oral (10 – 100 mg/kg) (Figura 8B) ou via intramuscular (10 – 30 µg/sítio) (Figura 8C) foi capaz de reduzir a nocicepção induzida pelo glutamato de forma dependente da dose, com valores de DI_{50} de 18,3 (13,4 – 24,9) mg/kg e 8,3 (6,4 – 10,8) µg/sítio e inibições de $92\pm 5\%$ e $85\pm 8\%$, respectivamente.

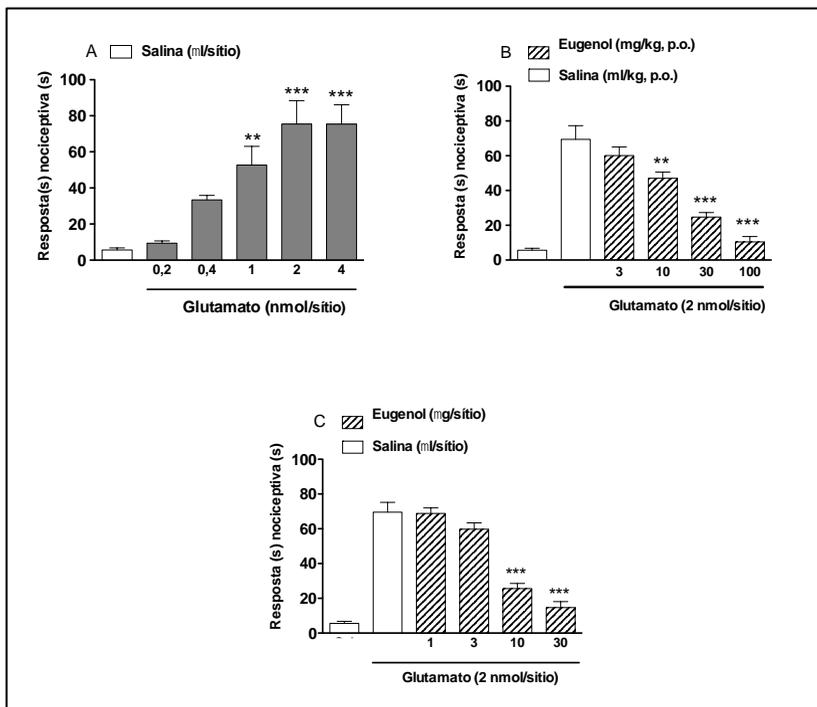


Figura 8: Efeito do eugenol sobre a nocicepção muscular orofacial induzida por glutamato em camundongos.

LEGENDA: O Painel A: representa os dados dos animais que receberam injeções i.m. no masséter em um volume de 10 µL/sítio de salina (veículo) ou glutamato (0,2 – 4 nmol/sítio). Painel B: representa os dados dos animais que receberam salina (10 ml/kg, p.o.) ou eugenol (3 – 100 mg/kg, p.o.) uma hora antes da injeção i.m. de glutamato (2 nmol/ 10 µL) no masseter. Painel C: representa os dados dos animais que receberam injeções i.m. no masséter em um volume de 10 µL/sítio de salina (veículo) ou eugenol (1 – 30 µg/ 5 µL) coadministrado com glutamato (2 nmol/ 5 µL). Cada coluna representa a média de 5-8 animais, e as linhas verticais indicam o EPM (erro padrão da média). Asteriscos denotam diferenças significativas comparado com o grupo controle (salina). (ANOVA de uma via seguido do teste de Newman-Keuls; ** $P < 0,01$ *** $P < 0,001$).

5.5 EFEITO DO MK-801 SOBRE A NOCICEPÇÃO MUSCULAR OROFACIAL INDUZIDA PELA INJEÇÃO DE NMDA NO MÚSCULO MASSETER DE CAMUNDONGOS

A Figura 9A demonstra que o NMDA (50 - 100 nmol/sítio, i.m.) injetado no músculo masseter de camundongos foi capaz de causar uma resposta nociceptiva dependente da dose quando comparado com o grupo tratado com salina. Além disso, podemos observar que o MK-801 (25 - 50 nmol/sítio, i.m.) reduziu a resposta nociceptiva induzida pelo NMDA de maneira dependente da dose, com valor de DI_{50} foi de 27,8 (19 - 40,6) nmol/sítio e de inibição de $79\pm 9\%$ (Figura 9 B).

5.6 EFEITO ANTINOCICEPTIVO SINÉRGICO DO EUGENOL E DO MK-801 NO MODELO DE NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA INJEÇÃO DE NMDA NO MÚSCULO MASSETER DE CAMUNDONGOS

Podemos observar na Figura 9C que o eugenol administrado pela via intramuscular (10 - 30 $\mu\text{g/sítio}$) foi capaz de reduzir a nocicepção induzida pelo NMDA, com valor de DI_{50} de 16,9 (9,4 - 30,7) $\mu\text{g/sítio}$ e inibição de $64\pm 9\%$. Além disso, a coadministração de doses subativas de eugenol e MK-801 foram capazes de reduzir de forma significativa a nocicepção induzida pelo NMDA com uma inibição de $75\pm 2\%$ (Figura 9D).

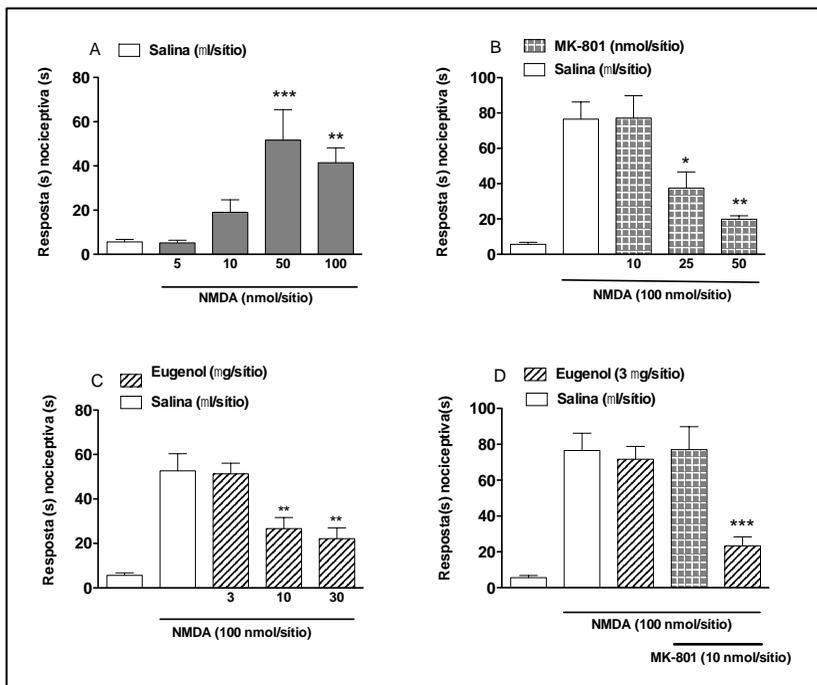


Figura 9: Efeito do NMDA injetado no músculo masséter de camundongos.

LEGENDA: O Painel A: representa a resposta nociceptiva causada pela injeção do agonista de receptores glutamatérgicos do subtipo NMDA na região muscular orofacial. Painel B: representa os dados dos animais que receberam injeções i.m. no masséter do MK-801 (10 – 50 nmol/5 μ L) juntamente com NMDA (100 nmol/5 μ L). Painel C: representa os dados dos animais que receberam salina (veículo) ou eugenol (3 – 30 μ g/5 μ L) coadministrado com NMDA (100 nmol/5 μ L); Painel D: representa os dados dos animais que receberam injeções i.m. no masséter de dose subefetivas de eugenol (3 μ g/5 μ L) e MK-801 (10 nmol/5 μ L) coadministrado com NMDA (100 mol/5 μ L). Cada coluna representa a média de 5-8 animais, e as linhas verticais indicam o EPM (erro padrão da média). Asteriscos denotam diferenças significativas comparado com o grupo controle (salina). (ANOVA de uma via seguido do teste de Newman-Keuls; * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$ *** $P < 0,001$).

5.7 EFEITO DO CNQX SOBRE A NOCICEPÇÃO MUSCULAR OROFACIAL INDUZIDA PELA INJEÇÃO DE AMPA NO MÚSCULO MASSETER DE CAMUNDONGOS

A Figura 10A mostra que o AMPA (0,3 - 10 nmol/sítio, i.m.) injetado no músculo masséter de camundongos foi capaz de causar uma resposta nociceptiva de maneira dependente da dose quando comparado com o grupo tratado com salina. Além disso, podemos observar na Figura 10B que o CNQX (1 - 10 nmol/sítio, i.m.) reduziu a resposta nociceptiva induzido pelo AMPA de maneira dependente da dose, com uma DI_{50} de 7,4 (5,3 - 9,8) nmol/sítio e inibição de $86\pm 2\%$.

5.8 EFEITO ANTINOCICEPTIVO SINÉRGICO DO EUGENOL E DO CNQX NO MODELO DE NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA INJEÇÃO DE AMPA NO MÚSCULO MASSETER DE CAMUNDONGOS

O eugenol administrado pela via intramuscular (1 - 10 $\mu\text{g/sítio}$) foi capaz de reduzir de maneira dependente da dose a nocicepção induzida pelo AMPA (Figura 10C), com valores de DI_{50} de 0,6 (0,2 - 1,8) $\mu\text{g/sítio}$ e inibição de $94\pm 3\%$. Além disso, a coadministração de doses subativas de eugenol e CNQX foi capaz de abolir completamente (100%) de forma sinérgica a nocicepção induzida pelo AMPA (Figura 10D).

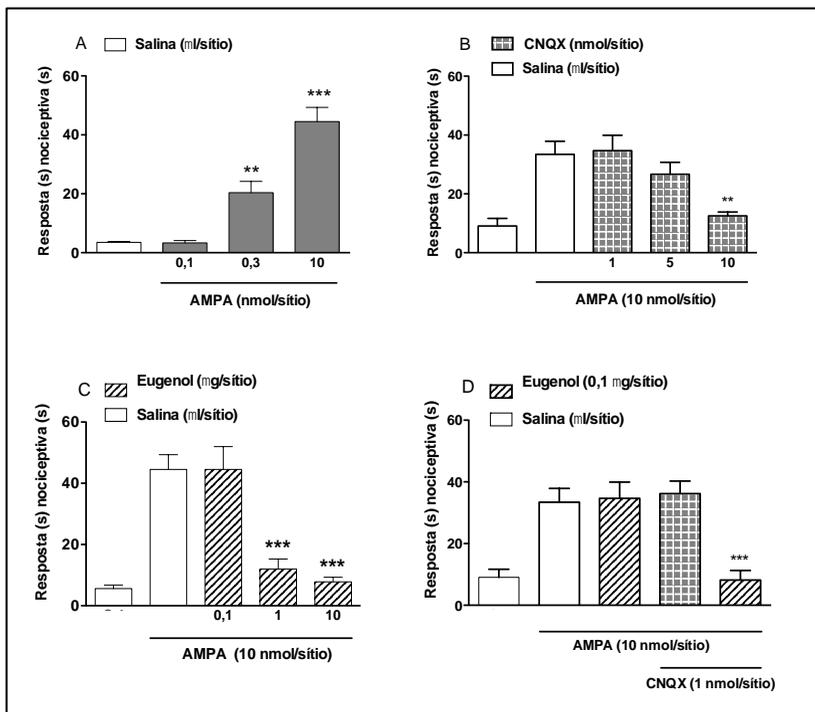


Figura 10: Efeito do AMPA injetado no músculo masséter de camundongos.

LEGENDA: O Painel A: representa a resposta nociceptiva causada pela injeção do agonista de receptores glutamatérgicos do subtipo AMPA na região muscular orofacial. Painel B: representa os dados dos animais que receberam injeções i.m. no masséter do CNQX (1 – 10 nmol/5 μ L) juntamente com AMPA (10 nmol/5 μ L). Painel C: representa os dados dos animais que receberam salina (veículo) ou eugenol (0,1 – 10 μ g/5 μ L) coadministrado com AMPA (10 nmol/5 μ L); Painel D: representa os dados dos animais que receberam injeções i.m. no masséter de dose-subefetivas de eugenol (0,1 μ g/5 μ L) e CNQX (1 nmol/5 μ L) coadministrado com AMPA (10 mol/5 μ L). Cada coluna representa a média de 5-8 animais, e as linhas verticais indicam o EPM (erro padrão da média). Asteriscos denotam diferenças significativas comparado com o grupo controle (salina). (ANOVA de uma via seguido do teste de Newman-Keuls; ** $P < 0,01$ *** $P < 0,001$).

5.9 EFEITO DO CNQX SOBRE A NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA INJEÇÃO DE CAINATO NO MÚSCULO MASSETER DE CAMUNDONGOS

A Figura 11A demonstra que o cainato (3 - 10 nmol/sítio, i.m.) injetado no músculo masséter de camundongos foi capaz de causar uma resposta nociceptiva de maneira dependente da dose quando comparado com o grupo tratado com salina. Podemos observar na Figura 11B que o CNQX (5 - 10 nmol/sítio, i.m.) reduziu de maneira dependente da dose a resposta nociceptiva induzida pelo cainato (10 nmol/sítio, i.m.) injetado no músculo masséter de camundongos, com valores de DI_{50} de 3,6 (2,1- 5,3) nmol/sítio e inibição de 100 %.

5.10 EFEITO ANTINOCICEPTIVO SINÉRGICO DO EUGENOL E DO CNQX NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA INJEÇÃO DE CAINATO NO MÚSCULO MASSETER DE CAMUNDONGOS

O eugenol administrado pela via intramuscular (3 - 10 μ g/sítio) foi capaz de reduzir de maneira dependente da dose a nocicepção induzida pelo cainato (Figura 11C), com uma inibição de 100%. Podemos também observar que a coadministração de doses subativas de eugenol e CNQX foi capaz de reduzir a nocicepção induzida pelo cainato de forma sinérgica (Figura 11D), com uma inibição de $68\pm 6\%$.

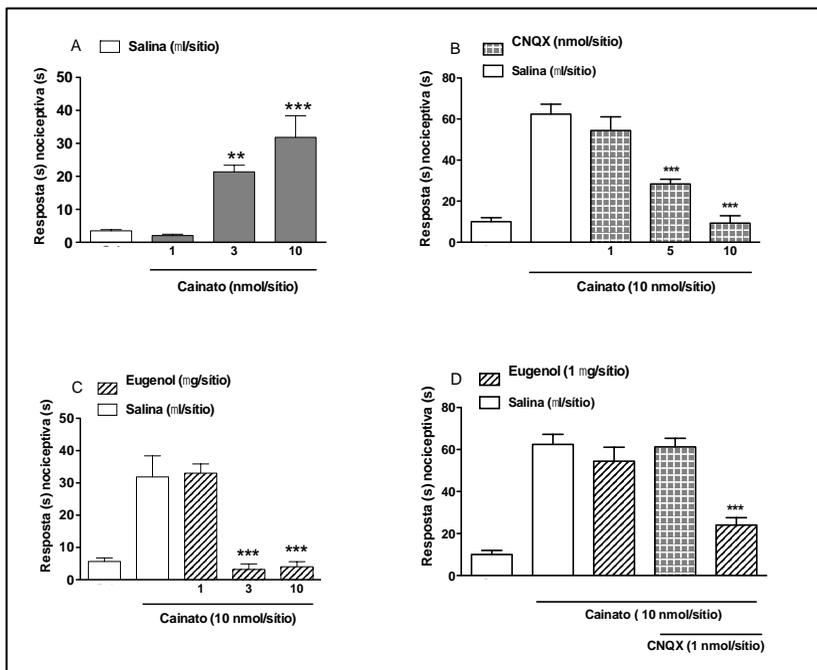


Figura 11: Efeito do cainato injetado no músculo masséter de camundongos.

LEGENDA:

O Painel A: representa a resposta nociceptiva causada pela injeção do agonista de receptores glutamatérgicos do subtipo cainato na região muscular orofacial.

Painel B: representa os dados dos animais que receberam injeções i.m. no masséter do CNQX (1 – 10 nmol/5 μ L) juntamente com cainato (10 nmol/5 μ L).

Painel C, representa os dados dos animais que receberam salina (veículo) ou eugenol (1 – 10 μ g/5 μ L) coadministrado com cainato (10 nmol/5 μ L);

Painel D, representa os dados dos animais que receberam injeções i.m. no masséter de doses subefetivas de eugenol (1 μ g/5 μ L) e CNQX (1 nmol/5 μ L) coadministrado com cainato (10 mol/5 μ L). Cada coluna representa a média de 5-8 animais, e as linhas verticais indicam o EPM (erro padrão da média). Asteriscos denotam diferenças significativas comparado com o grupo controle (salina). (ANOVA de uma via seguido do teste de Newman-Keuls; ** $P < 0,01$ *** $P < 0,001$).

5.11 EFEITO DO MCPG SOBRE A NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA INJEÇÃO DE TRANS-ACPD NO MÚSCULO MASSETER DE CAMUNDONGOS

A Figura 12A mostra que o trans-ACPD (50 - 200 nmol/sítio, i.m.) injetado no músculo masseter de camundongos foi capaz de causar uma resposta nociceptiva quando comparado com o grupo tratado com salina (10µL, sítio). Podemos observar na Figura 12B que o MCPG (1 - 1000 pmol/sítio, i.m.) reduziu o comportamento de nocicepção induzido pelo trans-ACPD (100 nmol/sítio, 5 µL), com uma inibição de $56\pm 2\%$.

5.12 EFEITO ANTINOCICEPTIVO SINÉRGICO DO EUGENOL E DO MCPG NO MODELO DE NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA INJEÇÃO DE TRANS-ACPD NO MÚSCULO MASSETER DE CAMUNDONGOS

O eugenol (3 - 10 µg/sítio) foi capaz de reduzir a nocicepção induzida pelo trans-ACPD (100 nmol/sítio, 5 µL) de forma dependente da dose (Figura 12 C), com valor de DI_{50} de 3,0 (1,6 - 5,8) µg/sítio e inibição de 100 %. Além disso, a coadministração de doses subativas de eugenol e MCPG foi capaz de reduzir a nocicepção induzida pelo trans-ACPD de forma sinérgica com uma inibição de $57\pm 9\%$ (Figura 12 D).

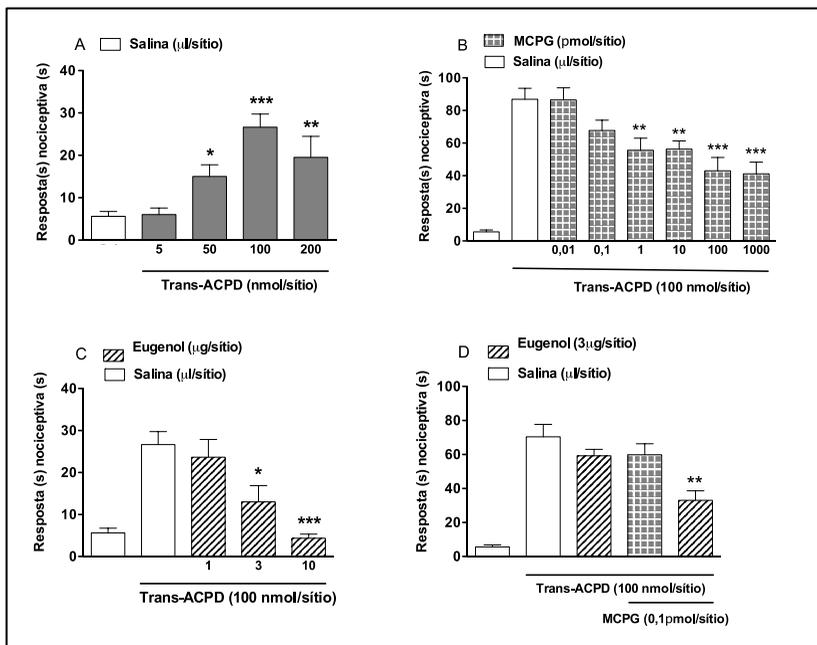


Figura 12: Efeito do trans-ACPD injetado no músculo masséter de camundongos.

LEGENDA:

O painel A: representa a resposta nociceptiva causada pela injeção do agonista de receptores glutamatérgicos do subtipo trans-ACPD na região muscular orofacial.

Painel B: representa os dados dos animais que receberam injeções i.m. no masséter do MCPG (0,01 – 1000 pmol/5 µL) juntamente com trans-ACPD (100 nmol/5 µL).

Painel C: representa os dados dos animais que receberam salina (5 µL) ou eugenol (1 – 10 µg/5 µL) coadministrado com trans-ACPD (100 nmol/5 µL);

Painel D: representa os dados dos animais que receberam injeções i.m. no masséter de doses subefetivas de eugenol (3 µg/5 µL) e MCPG (0,1 pmol/5 µL) coadministrado com trans-ACPD (100 nmol/5 µL). Cada coluna representa a média de 5-8 animais, e as linhas verticais indicam o EPM (erro padrão da média). Asteriscos denotam diferenças significativas comparado com o grupo controle (salina). (ANOVA de uma via seguido do teste de Newman-Keuls; * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$ *** $P < 0,001$).

5.13 EFEITO DA CAPSAZEPINA SOBRE A NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA INJEÇÃO DE CAPSAICINA NO MÚSCULO MASSETER DE CAMUNDONGOS

A Figura 13A demonstra que a capsaicina (1 - 10 nmol/sítio, i.m.) quando injetada no músculo masséter de camundongos foi capaz de induzir nocicepção de maneira dependente da dose quando comparado com o grupo tratado com salina (10µL, sítio). Além disso, podemos observar que a capsazepina (100 - 200 nmol/sítio, i.m.) reduziu a nocicepção induzida pela capsaicina (10 nmol/sítio, 5µL) (Figura 13B), com valor de DI_{50} de 122,3 (101,2 - 152,3) nmol/sítio e inibição de $76\pm 8\%$.

5.14 EFEITO ANTINOCICEPTIVO SINÉRGICO DO EUGENOL E DA CAPSAZEPINA NO MODELO DE NOCICEPÇÃO MUSCULAR OROFACIAL INDUZIDA PELA INJEÇÃO DE CAPSAICINA NO MÚSCULO MASSETER DE CAMUNDÓNGOS

Podemos observar na Figura 13C que o eugenol administrado pela via intramuscular (1 - 10 µg/sítio) foi capaz de reduzir a nocicepção induzida pela capsaicina, com valor de DI_{50} foi de 3,2 (1,8 - 5,3) µg/sítio e inibição de $64\pm 6\%$. A coadministração de doses subativas de eugenol e capsazepina foram capazes de reduzir de maneira sinérgica a nocicepção induzida pela capsaicina (Figura 13D) com uma inibição de $72\pm 7\%$.

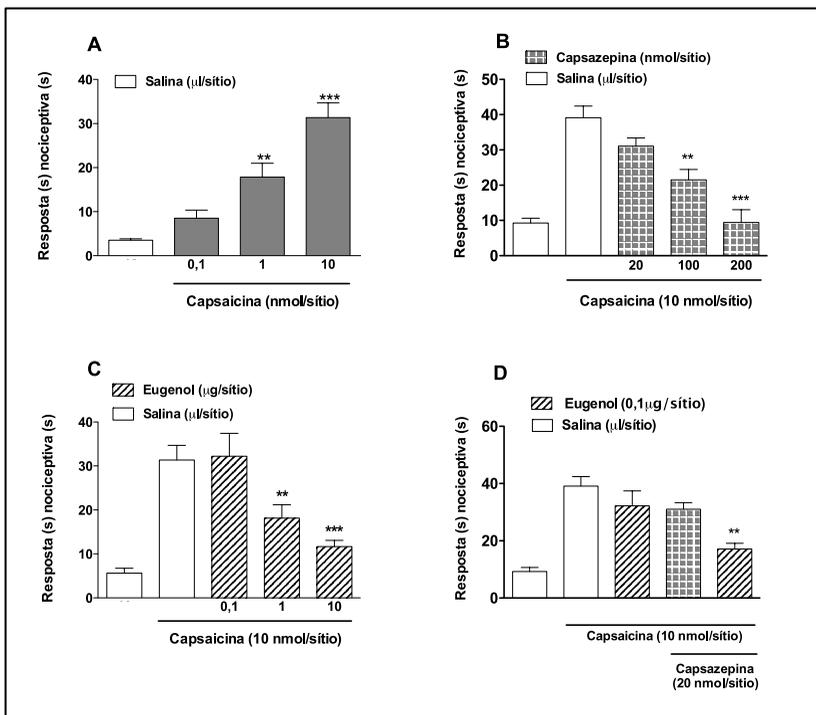


Figura 13: Efeito da capsaicina injetada no músculo masséter de camundongos.

LEGENDA:

O painel A: representa a resposta nociceptiva causada pela injeção do agonista dos receptores TRPV1 na região muscular orofacial.

Painel B: representa os dados dos animais que receberam injeções i.m. no masséter da capsazepina (20 – 200 nmol/5 μL) juntamente com capsaicina (10 nmol/5 μL).

Painel C: representa os dados dos animais que recebem salina (5 μL) ou eugenol (0,1 – 10 μg/5 μL) coadministrado com capsaicina (10 nmol/5 μL);

*Painel D: representa os dados dos animais que receberam injeções i.m. no masséter de dose-subefetivas de eugenol (0,1 μg/5 μL) e capsazepina (20 nmol/5 μL) coadministrado com capsaicina (10 nmol/5 μL). Cada coluna representa a média de 5-8 animais, e as linhas verticais indicam o EPM (erro padrão da média). Asteriscos denotam diferenças significativas comparado com o grupo controle (salina). (ANOVA de uma via seguido do teste de Newman-Keuls; **P<0,01 ***P<0,001).*

5.15 EFEITO DA CÂNFORA SOBRE A NOCICEPÇÃO MUSCULAR OROFACIAL INDUZIDA PELA INJEÇÃO DE CINAMALDEÍDO NO MÚSCULO MASSETER DE CAMUNDONGOS

A Figura 14A mostra que o cinamaldeído (50 - 100 nmol/sítio, i.m.) injetado no músculo masséter de camundongos induziu nocicepção de maneira dependente da dose quando comparado com o grupo tratado com salina (10 µL, sítio/). Além disso, podemos observar na Figura 14B que a cânfora (50 - 100 nmol/sítio, i.m.) reduziu a nocicepção induzido pelo cinamaldeído (100 nmol/sítio, 5 µL) de forma dependente da dose, com uma inibição $42\pm 3\%$.

5.16 EFEITO ANTINOCICEPTIVO SINÉRGICO DO EUGENOL E DA CÂNFORA NO MODELO DE NOCICEPÇÃO MUSCULAR OROFACIAL INDUZIDA PELA INJEÇÃO DE CINAMALDEÍDO NO MÚSCULO MASSETER DE CAMUNDONGOS

O eugenol administrado pela via intramuscular (0,1 µg/sítio) foi capaz de reduzir a nocicepção induzida pelo cinamaldeído de maneira dependente da dose (Figura 14C), com valores de DI_{50} de 21,5 (13,2 - 27,2) µg/sítio e inibição de $56\pm 12\%$. Além disso, a coadministração de doses subativas de eugenol e cânfora foi capaz de reduzir de forma sinérgica a nocicepção induzida pelo cinamaldeído (Figura 14D) com inibição de $73\pm 5\%$.

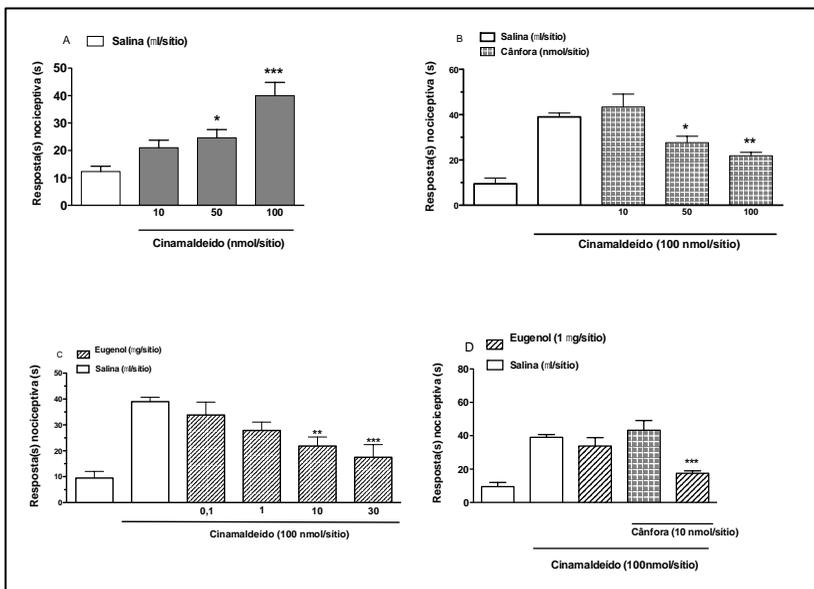


Figura 14: Efeito do cinamaldeído injetado no músculo masséter de camundongos.

LEGENDA:

O painel A: representa a resposta nociceptiva causada pela injeção do agonista de receptores TRPs do subtipo cinamaldeído na região muscular orofacial.

Painel B: representa os dados dos animais que receberam injeções i.m. no masséter de cãnfora (10 – 100 nmol/5 µL) juntamente com cinamaldeído (100 nmol/5 µL).

Painel C: representa os dados dos animais que receberam salina (5µL) ou eugenol (0,1 – 30 µg/5 µL) coadministrado com cinamaldeído (100 nmol/ 5 µL);

*Painel D: representa os dados dos animais que receberam injeções i.m. no masséter de doses sub efetivas de eugenol (1 µg/5 µL) e cãnfora (10 nmol/5 µL) coadministrados com cinamaldeído (100 mol/5 µL). Cada coluna representa a média de 5-8 animais, e as linhas verticais indicam o EPM (erro padrão da média). Asteriscos denotam diferenças significativas comparado com o grupo controle (salina). (ANOVA de uma via seguido do teste de Newman-Keuls; * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$ *** $P < 0,001$).*

5.17 EFEITO DO VERMELHO DE RUTÊNIO SOBRE A NOCICEPÇÃO MUSCULAR OROFACIAL INDUZIDA PELA INJEÇÃO DE MENTOL NO MÚSCULO MASSETER DE CAMUNDONGOS

A Figura 15A mostra que o mentol (10 nmol/sítio) injetado no músculo masséter de camundongos induziu significativa nocicepção quando comparado com o grupo tratado com salina (10 μ L, sítio). Além disso, podemos observar na Figura 15B que o vermelho de rutênio (10 nmol/sítio, 5 μ L) reduziu a nocicepção induzida pelo mentol (10 nmol/sítio, 5 μ L), com valores de DI_{50} de 4,8 (1,9 - 7,3) nmol/sítio e inibição de $61 \pm 6\%$.

5.18 EFEITO ANTINOCICEPTIVO SINÉRGICO DO EUGENOL E DO VERMELHO DE RUTÊNIO NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELO MENTOL INJETADO NO MUSCULO MASSETER DE CAMUNDONGOS

Quando administrado pela via intramuscular, o eugenol (5 - 30 μ g/sítio) foi capaz de reduzir a nocicepção induzida pelo mentol (10 nmol/sítio, 5 μ L) de maneira dependente da dose (Figura 15 C). Os valores de DI_{50} e da inibição foram respectivamente de 4,6 (1,6 - 7,0) μ g/sítio e $76 \pm 1\%$. Além disso, a coadministração de doses subativas de eugenol e vermelho de rutênio foi capaz de reduzir de forma sinérgica a nocicepção induzida pelo mentol (Figura 15D) com inibição de 100%.

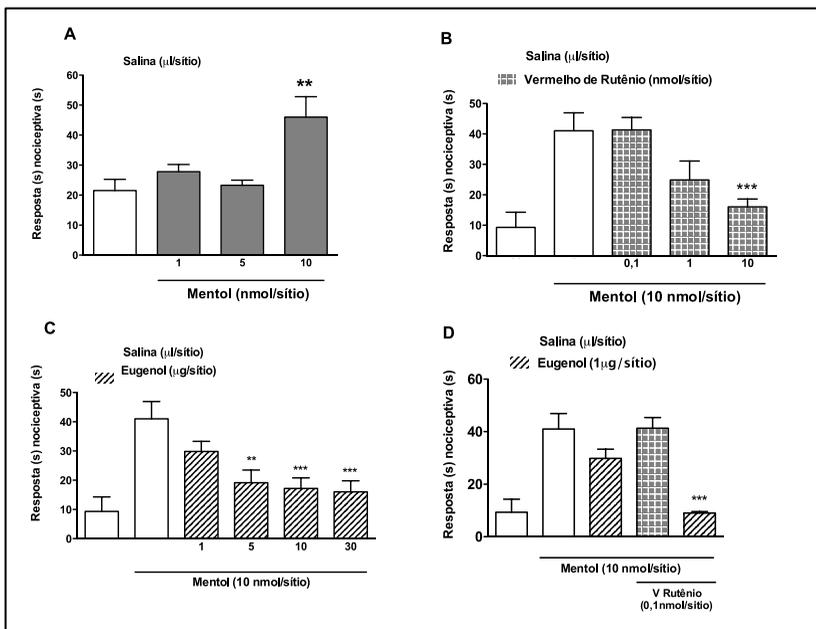


Figura 15: Efeito do mentol injetado no músculo massêter de camundongos.

LEGENDA:

O painel A: representa a resposta nociceptiva causada pela injeção do agonista de receptores TRPs do subtipo TRPM8 na região muscular orofacial.

Painel B: representa os dados dos animais que receberam injeções i.m. no massêter de vermelho de rutênio (0,5 – 10 nmol/5 μL) juntamente com mentol (10 nmol/5 μL).

Painel C: representa os dados dos animais que receberam salina (5 μL) ou eugenol (1 – 30 $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$) coadministrado com mentol (10 nmol/5 μL);

Painel D: representa os dados dos animais que receberam injeções i.m. no massêter de doses subefetivas de eugenol (1 $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$) e vermelho de rutênio (0,1 nmol/5 μL) coadministrados com mentol (10 mol/5 μL). Cada coluna representa a média de 5-8 animais, e as linhas verticais indicam o EPM (erro padrão da média). Asteriscos denotam diferenças significativas comparado com o grupo controle (salina). (ANOVA de uma via seguido do teste de Newman-Keuls; ** $P < 0,01$ *** $P < 0,001$).

5.19 EFEITO DA AMILORIDA SOBRE A NOCICEPÇÃO MUSCULAR OROFACIAL INDUZIDA PELA INJEÇÃO DE SALINA ACIDIFICADA NO MÚSCULO MASSETER DE CAMUNDONGOS

A salina acidificada (pH 1,98/ sítio, 10 μ L) foi capaz de induzir a nocicepção quando injetada no masseter dos camundongos (Figura 16A). Observou-se que a amilorida (3- 30 nmol/sítio) reduziu o comportamento nociceptivo induzido pela salina acidificada de forma dependente da dose, quando comparado com o grupo tratado com salina (10 μ L, sítio) com valores de DI₅₀ e inibição de respectivamente 5,2 (3,7 - 7,2) nmol/sítio e 100 % (Figura 16 A).

5.20 EFEITO ANTINOCICEPTIVO SINÉRGICO DO EUGENOL E DA AMILORIDA NO MODELO DE NOCICEPÇÃO MUSCULAR OROFACIAL INDUZIDA PELA INJEÇÃO DE SALINA ACIDIFICADA NO MÚSCULO MASSETER DE CAMUNDONGOS

Como demonstrado na Figura 16B, o eugenol administrado pela via intramuscular (1 – 10 μ g/sítio) foi capaz de reduzir a nocicepção induzida pela salina ácida quando coinjectado com a mesma com valores de DI₅₀ e inibição respectivamente de 0,6 (0,2 - 0,7) μ g/ sítio e 88 \pm 8%. Podemos também observar que a coadministração de doses subativas de eugenol e amilorida foi capaz de reduzir a nocicepção induzida pela salina acidificada de forma sinérgica com uma inibição de 77 \pm 7% (Figura 16C).

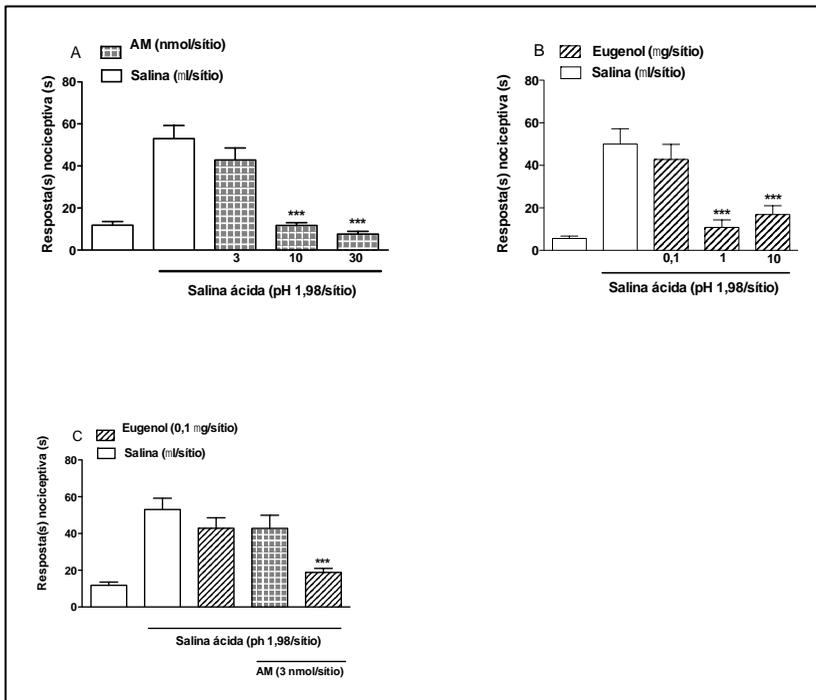


Figura 16: Efeito da salina acidificada injetado no músculo masséter de camundongos.

LEGENDA:

O painel A: representa os dados dos animais que receberam injeções i.m. no masséter de amilorida (3 – 30 nmol/5 μ L) juntamente com salina acidificada (pH 1,98, 5 μ L/sítio).

Painel B: representa os dados dos animais que receberam salina (5 μ L) ou eugenol (0,1 – 10 μ g/5 μ L) coadministrado com salina acidificada (pH 1,98, 5 μ L/sítio);

Painel C: representa os dados dos animais que receberam injeções i.m. no masséter de doses subefetivas de eugenol (0,1 μ g/5 μ L) e amilorida (3 nmol/5 μ L) coadministrados com salina acidificada (1,98/sítio, 5 μ L). Cada coluna representa a média de 5-8 animais, e as linhas verticais indicam o EPM (erro padrão da média). Asteriscos denotam diferenças significativas comparado com o grupo controle (salina). (ANOVA de uma via seguido do teste de Newman-Keuls; *** $P < 0,001$).

6 DISCUSSÃO

A dor muscular orofacial, um sintoma resultante das DTMs, é uma denominação geral para descrever vários sinais e sintomas clínicos que envolvem os músculos mastigatórios, a articulação temporomandibular e estruturas associadas (MANFREDINI; LOBBEZOO, 2010). A etiologia das DTMs, embora muito pesquisada, ainda não está totalmente elucidada. No entanto, sabe-se que alterações oclusais, estresse, ansiedade, hábitos parafuncionais, traumas e microtraumas, instabilidade mandibular, desequilíbrios posturais, dentre outros, são fatores frequentemente observados em pacientes portadores de DTMs (STOHLER, 1999). Desta forma, as DTMs possuem uma etiologia multifatorial e normalmente necessitam de uma abordagem multidisciplinar para se obter um tratamento de considerável efetividade. A dor é o sintoma das DTMs que mais prejudica a qualidade de vida dos pacientes. Especificamente falando, as dores musculares que acometem a região orofacial são normalmente induzidas por palpação manual ou ocorrem até mesmo espontaneamente (HEDENBERG-MAGNUSSON; ERNBERG; KOPP, 1997). Estas condições também estão associadas com uma redução da força máxima e limitação dos movimentos mandibulares (LUND et al., 1991; MOLIN, 1972), que pode resultar na sensibilização periférica de nociceptores presentes na musculatura orofacial. Assim sendo, uma característica importante associada à condição de dor muscular é a ocorrência de alterações na sensibilidade mecânica do tecido muscular, no entanto, os mecanismos fisiopatológicos que levam ao desenvolvimento da dor ainda são pouco compreendidos (MENSE, 1993).

Estudos realizados em humanos demonstraram que a injeção de glutamato no músculo masseter aumentou o pico e a duração das dores, bem como a presença de dores referidas quando estes sintomas foram comparados com os de pacientes voluntários que receberam a injeção de salina isotônica no mesmo local (CAIRNS et al., 2001a). Além disso, corroborando com a epidemiologia da dor muscular orofacial, os sinais e sintomas de dor são significativamente aumentados pelo glutamato, sendo mais pronunciados nas mulheres do que nos homens (CAIRNS et al., 2003; SVENSSON et al., 2003).

O glutamato, principal aminoácido excitatório envolvido na transmissão dolorosa, possui a capacidade de excitar os neurônios ganglionares do nervo trigêmeo. Isto se dá devido à distribuição de seus receptores nesta região e devido à liberação deste aminoácido

excitatório após estimulação nociceptiva dos terminais trigeminais (BATTAGLIA; RUSTIONI, 1988; CARLTON, 2001; KAI-KAI; HOWE, 1991; WANAKA et al., 1987; WESTLUND; MCNEILL; COGGESHALL, 1989). Assim, baseando-se principalmente em dois trabalhos que utilizaram ratos para mimetizar a dor muscular orofacial (RO; SVENSSON; CAPRA, 2002; SHIMADA; LAMOTTE, 2008), procuramos desenvolver em nosso laboratório o modelo de nocicepção que mimetiza o tipo de dor muscular orofacial, todavia, em camundongos.

Foi observado que, quando injetado na articulação temporomandibular e no músculo masseter, o glutamato promove uma sensibilização central e periférica via ativação dos receptores glutamatérgicos localizados periféricamente (IVANUSIC et al., 2011). Este neurotransmissor é capaz de provocar a ativação de neurônios aferentes primários de pequeno diâmetro presentes no músculo masseter, e esta função está intimamente correlacionada com estudos clínicos, onde a dor foi relatada por indivíduos que receberam injeções locais de glutamato nesta região (CAIRNS et al., 2001b; IVANUSIC et al., 2011; LAM et al., 2005).

Deve-se ressaltar que apesar das lesões nos tecidos orofaciais acarretarem inflamação e degeneração, a maioria das DTMs não estão associadas com inflamação intensa (LAM et al., 2005). A fibromialgia pode ser citada como um exemplo, pois nesta patologia sinais de lesão tecidual ou alterações inflamatórias não são observados (CLAUW; CROFFORD, 2003; HENRIKSSON; SÖRENSEN, 2002). De fato, resultados descritos na literatura demonstram que a ativação de receptores glutamatérgicos periféricos através da injeção de glutamato na ATM ou em músculos craniofaciais, causa resposta nociceptiva similar àquela causada por substâncias inflamatórias sem resultar em inflamação nestes tecidos (YU et al., 1996; FIORENTINO; LAM et al., 2004). Com base nestes achados, pode-se afirmar que o glutamato constitui-se de um mediador químico endógeno com excelente perfil para ser utilizado em pesquisas pré-clínicas com a finalidade de aprimorar o entendimento, e principalmente buscar novas abordagens terapêuticas para as dores musculares não inflamatórias.

Até o presente momento, poucos trabalhos têm demonstrado uma correlação entre o eugenol e o sistema glutamatérgico, sendo que a grande maioria destes demonstram efeitos obtidos em estudos *in vitro*, principalmente envolvendo o receptor glutamatérgico NMDA. Wie et al. (1997) demonstraram que o eugenol inibe a excitotoxicidade bem como lesões oxidativas em culturas de células neuronais corticais, além de

proteger contra neurotoxicidade induzida pelo NMDA. O efeito neuroprotetor do eugenol pode ser mediado pela inibição da captação de Ca^{2+} , que resulta na modulação do receptor glutamatérgico do tipo NMDA. Além disso, foi demonstrado também que o bloqueio das correntes de Ca^{2+} exercido pelo eugenol reduz o potencial de membrana neuronal e as respostas excitatórias promovidas pelo glutamato. Por meio da modulação do receptor NMDA, o eugenol também foi capaz de proteger neurônios hipocâmpais de isquemias e retardar convulsões induzidas pelo agonista NMDA (WIE et al. 1997).

Com o intuito de confirmar os dados pré-existentes na literatura a respeito dos possíveis efeitos e mecanismos antinociceptivos do eugenol, o primeiro objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do eugenol em modelos de nocicepção aguda, visando correlacionar sua ação tanto a nível periférico como central, sobre o sistema glutamatérgico.

Os resultados iniciais apresentados demonstram de forma clara que o eugenol administrado por via oral ou intraperitoneal provoca um efeito antinociceptivo, mostrando-se eficaz em reduzir tanto as contorções abdominais induzidas pela injeção de ácido acético como a nocicepção provocada pela injeção intraplantar de glutamato (nocicepção periférica). O comportamento de contorção abdominal frente à injeção de ácido acético em camundongos tem sido utilizado como um modelo de nocicepção inflamatória visceral, sendo amplamente utilizado em pesquisas pré-clínicas, como uma ferramenta para a avaliação da propriedade de novos agentes analgésicos e anti-inflamatórios (COLLIER et al., 1968; TJØLSEN et al., 1992). Estudos anteriores sugerem que a administração de ácido acético foi capaz de induzir a liberação de mediadores inflamatórios endógenos como substância P, bradicinina, prostanóides e citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-8) a partir de macrófagos e mastócitos presentes na cavidade abdominal, os quais estimulam neurônios nociceptivos (COLLIER et al., 1968; IKEDA et al., 2001; RIBEIRO et al., 2000). Além disso, a injeção de ácido acético induz também um aumento nas concentrações de glutamato e aspartato no líquido cérebro espinal (FENG et al., 2008). Através de nossos resultados, pudemos confirmar e ampliar os dados publicados por Park; Sim; Lee (2011), onde ambos corroboram sobre os efeitos analgésicos e mecanismos de ação do eugenol quando administrado pelas vias oral e intraperitoneal utilizando esse modelo, demonstrando que o eugenol foi eficaz em reduzir o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético de forma dependente da dose quando administrado por essas vias.

Com relação ao glutamato, já está bem estabelecido na literatura que este aminoácido é um dos principais neurotransmissores excitatórios envolvidos na transmissão de sinais nociceptivos, através da ativação direta dos receptores glutamatérgicos nas fibras nociceptivas. Uma vez ativados, estes neurônios liberam vários mediadores inflamatórios e neuropeptídeos tanto no sistema nervoso central quanto no periférico (MILLAN, 1999; FUNDYTUS, 2001). Os resultados apresentados neste trabalho demonstram, pela primeira vez, que o eugenol administrado pela via intraperitoneal produziu uma resposta antinociceptiva consistente e dependente da dose frente à nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato em camundongos. Por outro lado, foi demonstrado anteriormente que a nocicepção induzida pelo glutamato pode ser mediada pela ativação dos receptores NMDA e não-NMDA e pela liberação de óxido nítrico (BEIRITH; SANTOS; CALIXTO, 2002). Além disso, estes autores observaram que a resposta nociceptiva induzida pelo glutamato parece envolver locais de ação periféricos, espinais e supra-espinais. Assim, nossos dados iniciais demonstraram claramente que o eugenol é capaz de inibir a nocicepção causada pelo glutamato, sugerindo que este sistema está envolvido no seu mecanismo de ação. No entanto, surgiu a necessidade de investigar se o efeito antinociceptivo do eugenol dependia de uma ação a nível periférico ou central, além de avaliar sobre quais receptores glutamatérgicos ele estaria exercendo este efeito.

Como mencionado anteriormente, o glutamato é o agonista endógeno dos seus respectivos receptores ionotrópicos NMDA, AMPA, cainato e metabotrópicos, os quais possuem entre si diferentes distribuições teciduais e sinalizações intracelulares (KEW; KEMP, 2005). Os resultados do presente estudo demonstraram que o eugenol foi capaz de inibir de forma significativa a resposta nociceptiva causada pelo glutamato, AMPA e cainato, mas não por NMDA e trans-ACPD, quando estes foram injetados intratecalmente. Estes dados sugerem que um dos possíveis mecanismos de ação antinociceptiva causado pelo eugenol sobre a neurotransmissão glutamatérgica depende, pelo menos em parte, do bloqueio direto ou indireto dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos AMPA e Cainato. É importante salientar que o eugenol não foi capaz de reduzir a nocicepção causada pela injeção intratecal de NMDA e trans-ACPD. No entanto, outros autores demonstraram que o eugenol foi capaz de reduzir a neurotoxicidade induzida por NMDA em culturas corticais primárias de camundongos e apesar deste composto ter sido capaz de reduzir a morte neuronal em 80%, o influxo de Ca^{2+} foi reduzido em apenas 30%, o que pode sugerir a participação de outros

mecanismos, como por exemplo, a inibição através dos receptores de AMPA e cainato (WIE et al., 1997). Um estudo utilizando o metileugenol, um composto relacionado do eugenol, porém estruturalmente diferente, demonstrou que o efeito nociceptivo induzido pelo NMDA foi inibido pelo pré-tratamento com bicuculina. Este último, é um antagonista do receptor GABA_A, o que favorece nossos resultados, pois sugere a participação de um receptor não-NMDA (YANO et al., 2006). Desta forma, concluímos parcialmente a partir dos nossos resultados iniciais, que a ação antinociceptiva do eugenol pode ser regulada via receptores glutamatérgicos ionotrópicos AMPA e cainato, que atuam possivelmente modulando a transmissão nociceptiva a nível espinal.

A partir destes dados iniciais, nos quais o eugenol foi efetivo em reduzir a nocicepção via sistema glutamatérgico, a próxima etapa de nosso estudo foi investigar a ação do eugenol em outro modelo de dor dependente do sistema glutamatérgico, contudo, que permitisse uma translação com a DTM em humanos. Assim sendo, o efeito do eugenol foi analisado no modelo de dor muscular orofacial induzida pelo glutamato em camundongos, sendo importante salientar que nosso grupo de pesquisa foi o primeiro a padronizar este modelo de nocicepção em camundongos.

Conforme ilustrado na figura 8, a injeção intramuscular de glutamato no masseter de camundongos foi capaz de induzir um comportamento vigoroso de nocicepção assim como havia sido demonstrado em ratos através da injeção de óleo de mostarda, como descrito por Ro; Svensson; Capra (2002).

Embora na literatura existam vários trabalhos pré-clínicos demonstrando que o eugenol possui atividade antinociceptiva (GUÉNETTE et al., 2006, 2007), nenhum destes trabalhos investigou se este efeito seria dependente, pelo menos em parte, do seu envolvimento com o sistema glutamatérgico, e se o eugenol poderia também exercer esse efeito antinociceptivo sobre um modelo de dor muscular, especificamente neste caso, na região orofacial. Um estudo recente investigou o efeito antinociceptivo do eugenol administrado pela via oral em vários testes de nocicepção, dentre eles, a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato (PARK; SIM; LEE, 2011). Estes autores demonstraram que o eugenol administrado pela via oral, foi capaz de reduzir o comportamento nociceptivo induzido pelo glutamato em camundongos. No entanto, este resultado por si só não sugere que o mecanismo de analgesia induzido pelo eugenol seja a modulação direta de algum receptor glutamatérgico.

No presente trabalho, foi demonstrado que os agonistas de receptores glutamatérgicos ionotrópicos (NMDA e não-NMDA) e metabotrópicos do grupo 1 e 5 (trans-ACPD) também foram capazes de induzir nocicepção muscular orofacial em camundongos. Esses dados são inéditos, e demonstram que este modelo pode ser muito útil para estudar este tipo de dor e que o mesmo pode permitir uma extrapolação muito importante para humanos, não havendo obrigatoriamente a necessidade da utilização de ratos para estudar a dor muscular orofacial. É importante salientar que a utilização de ratos normalmente pode levar a um consumo maior de comida e de água, além disso estes animais ocupam um espaço físico maior quando comparados com camundongos e, ainda, quando avaliados experimentalmente, os ratos necessitam de maiores quantidades de drogas e/ou reagentes. Desta forma, a utilização de ratos em experimentos pré-clínicos torna-se substancialmente mais onerosa do que a utilização de camundongos, o que torna mais vantajoso o modelo animal padronizado neste trabalho.

Fundamentando-se em prévias explanações, após a padronização do modelo animal de dor muscular orofacial, nós averiguamos se o eugenol, o principal constituinte do cravo-da-índia, poderia exercer seu efeito analgésico sobre a nocicepção induzida pelos diferentes agonistas específicos dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos e metabotrópicos. Isso se justifica pelo fato de o eugenol possuir um reconhecido efeito analgésico em modelos animais (GUÉNETTE et al., 2007), sendo demonstrado que parte deste efeito se dá pela inibição das correntes iônicas de canais de K^+ (LI et al., 2007), Ca^+ (LEE et al., 2005) e Na^+ (CHO et al., 2008).

Deste modo, avaliamos o efeito do eugenol administrado pela via oral sobre a nocicepção induzida pela injeção i.m. de glutamato no masséter direito de camundongos. Como demonstrado na Figura 8, o eugenol foi capaz de reduzir a nocicepção induzida pelo glutamato quando administrado tanto pela via oral (8B) ou localmente (8C), na região intramuscular do músculo masseter com valores significativos de inibições de 92 ± 5 e $85 \pm 8\%$, respectivamente, mostrando-se eficaz na redução do comportamento nociceptivo induzido por esse agonista. Estudos farmacocinéticos demonstram que o eugenol é rapidamente e amplamente absorvido pela via oral (FISCHER; VON UNRUH; DENGLER, 1990), corroborando e sustentando os nossos resultados. As diferenças de potência entre as administrações oral e local (intramuscular) são esperadas e facilmente explicadas pelas características de biodisponibilidade de cada via.

Após alcançar os primeiros objetivos deste trabalho, que foram a padronização do modelo em camundongos e a avaliação do efeito do eugenol neste modelo, focamos nosso estudo na busca pela realização de nosso terceiro objetivo: avaliar o envolvimento dos receptores de glutamato na indução da dor muscular orofacial, e o envolvimento destes no efeito antinociceptivo apresentado pelo eugenol. Sabemos que a nocicepção muscular orofacial induzida pelo glutamato ocorre em virtude da ativação de seus receptores específicos, ionotrópicos (NMDA, AMPA e cainato) e metabotrópicos (LAM et al., 2005), embora não saibamos o quanto cada um destes receptores contribua separadamente.

Os receptores NMDA periféricos parecem ter uma importante função nos efeitos induzidos pelo glutamato sobre as fibras aferentes nociceptivas, pois antagonistas do receptor NMDA aplicados localmente no masseter foram capazes de reduzir as descargas aferentes induzidas pelo glutamato (CAIRNS et al., 2003). Além disso, a concentração necessária de glutamato injetada no masseter para induzir descargas aferentes através da ativação do receptor periférico de NMDA, é similar à concentração de glutamato que pode ser liberado de vesículas pré-sinápticas de fibras do músculo masséter após excitação aferente (RIVEROS; ORREGO, 1986).

Os resultados do presente estudo demonstraram que o agonista dos receptores NMDA induziu nocicepção quando injetado no masséter de camundongos similarmente ao glutamato (Figura 9A). Assim, concluímos que este comportamento nociceptivo ocorreu devido à ativação direta dos receptores NMDA. O eugenol por sua vez, quando coadministrado com o NMDA, foi capaz de prevenir esta nocicepção com uma inibição de $64\pm 9\%$, sugerindo que esse fenilpropano possa estar bloqueando especificamente este canal, e impedindo a ativação do mesmo pelo NMDA, e desta forma contribuindo para o efeito antinociceptivo (Figura 9C). Outra evidência importante de que realmente um dos efeitos do eugenol se dá via receptor NMDA, pode ser observada na figura 9D. Doses subativas de MK-801 e eugenol quando administradas conjuntamente, foram capazes de reduzir a nocicepção induzida pelo glutamato com uma inibição de $75\pm 2\%$ do comportamento nociceptivo. Estes resultados sugerem que ambas as substâncias possam atuar de forma sinérgica no mesmo local, no caso, no receptor NMDA.

Os receptores ionotrópicos não-NMDA, AMPA e cainato, também são por si só facilitadores da dor muscular orofacial. Assim, demonstramos que a injeção de ambos os agonistas dos receptores glutamatérgicos induziram comportamento nociceptivo se comparado

com o grupo controle (Figuras 10A e 11A), embora o tempo deste comportamento tenha sido menor em comparação com os grupos que receberam glutamato ou NMDA. Isto nos sugere que a ativação do receptor NMDA parece ter uma participação maior para induzir nocicepção e excitação neuronal se comparado com os receptores AMPA e cainato. Além disso, podemos observar que o efeito do eugenol sobre a nocicepção induzida por AMPA e cainato (Figuras 10C e 11C) foi mais pronunciado se comparado ao efeito do eugenol sobre a nocicepção induzida pelo NMDA, com valores de inibição do comportamento de wiping para o NMDA, AMPA, e cainato de respectivamente 64 ± 9 , 94 ± 3 , e 100%. Estes dados demonstram mais uma vez que a nocicepção induzida pelo NMDA é mais vigorosa e, além disso, que o eugenol parece estar exercendo um maior efeito antinociceptivo sobre os receptores AMPA e cainato do que pelos receptores NMDA. Embora a indução de nocicepção pelo AMPA e cainato em outros modelos animais já esteja muito bem estabelecida (CARLTON; COGGESHALL, 1998; ZHOU; BONASERA; CARLTON, 1996), esses resultados são os primeiros a demonstrar que a injeção de AMPA e cainato no músculo masseter induzem comportamento nociceptivo. Um trabalho correlacionado, demonstrou que antagonistas de AMPA/cainato reduziram a nocicepção e a ativação de c-fos em ratos que receberam injeção de óleo de mostarda no masséter quando injetados perifericamente (CHUN et al., 2008). Além disso, demonstramos também que o CNQX, um potente antagonista dos receptores AMPA e cainato, também foi capaz de reduzir a nocicepção em doses subativas quando coadministradas com doses subativas de eugenol (Figuras 10D e 11D), com inibições de 100 e $68\pm 6\%$, respectivamente. Isto demonstra uma maior especificidade do eugenol em atuar nos referidos receptores glutamatérgicos, principalmente em AMPA, quando associado ao antagonista CNQX, sugerindo que uma associação dessas substâncias poderia ser útil futuramente no controle das DTMs musculares.

No presente estudo, os agonistas NMDA, AMPA e cainato induziram nocicepção quando injetados no músculo masseter direito de camundongos, indo ao encontro do estudo de Cairns et al. (2001b) que demonstraram que a coadministração de antagonistas NMDA e não-NMDA reduziu a atividade elétrica dos neurônios aferentes primários presentes nessa região. Assim, esses dados analisados em conjunto, sugerem que os receptores periféricos glutamatérgicos ionotrópicos estão fortemente envolvidos na dor muscular orofacial.

Conjuntamente, os receptores metabotrópicos de glutamato também estão envolvidos na nocicepção orofacial localizando-se nos neurônios aferentes primários (CAIRNS et al., 2001a; LAM et al., 2005), no entanto, poucos estudos têm avaliado sua função na dor muscular orofacial. Lee e Ro (2007) induziram uma inflamação no masséter através da injeção de CFA e observaram um aumento na expressão dos receptores glutamatérgicos metabotrópicos do grupo 5 (mGluR5) no gânglio trigeminal, indicando que estes receptores podem mediar a nocicepção induzida por inflamação, ou seja, estes receptores também participam da transmissão dolorosa muscular orofacial (LEE; RO, 2007). Como sugerido por estes autores, observamos que os receptores metabotrópicos de glutamato mediarão a nocicepção no masseter, pois a injeção de trans-ACPD foi capaz de induzir comportamento nociceptivo (Figura 12A), embora a nocicepção tenha sido ainda menor do que a induzida pelo AMPA ou cainato. Além disso, os resultados demonstraram que tanto o antagonista dos receptores metabotrópicos do grupo I (MCPG) quanto o eugenol foram efetivos em reduzir a nocicepção induzida pelo trans-ACPD com inibições de $56\pm 2\%$ e 100% , respectivamente. Neste caso, o eugenol aboliu completamente o efeito nociceptivo induzido pelo agonista dos receptores metabotrópicos do grupo I, sugerindo fortemente uma ação antinociceptiva do eugenol sobre esse grupo de receptores. Como abordagem para confirmar estes resultados, demonstramos também a existência de um efeito sinérgico quando da coadministração de doses subativas do MCPG e eugenol, com uma inibição do comportamento nociceptivo de $57\pm 9\%$, o que estende nossos dados de que a atividade antinociceptiva do eugenol também parece envolver a inibição dos receptores glutamatérgicos metabotrópicos do grupo I.

As evidências até aqui apresentadas sugerem que o mecanismo de ação analgésica do eugenol se dá em parte pelo bloqueio, em maior ou menor grau, de todos os receptores glutamatérgicos testados, já que este composto inibiu o comportamento de wipping apresentado pelos animais frente a injeção dos seus respectivos agonistas. Da mesma forma, quando os antagonistas foram testados, e quando realizada a associação de doses subativas destes com doses subativas de eugenol, todas estas substâncias também foram capazes de reverter o comportamento de wipping apresentado pelos animais.

Esses resultados sugerem que o eugenol e os antagonistas de todos os receptores glutamatérgicos testados possam atuar de maneira sinérgica sobre os receptores glutamatérgicos prevenindo a nocicepção. Com base nisso, pode-se sugerir que essa associação possa contribuir

futuramente para a pesquisa de novos fármacos que sejam eficazes no controle da dor muscular orofacial e conseqüentemente na qualidade de vida de seus portadores. A Figura 17 demonstra o possível mecanismo de ação antinociceptiva do eugenol sobre o sistema glutamatérgico.

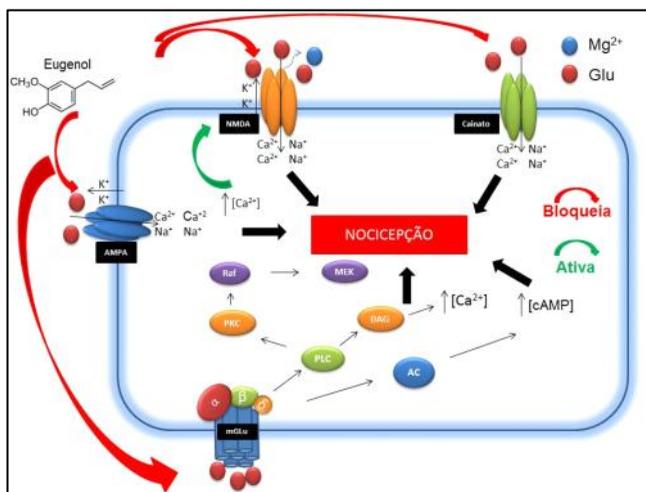


Figura 17: Prováveis mecanismos de ação antinociceptiva do eugenol envolvendo o sistema glutamatérgico.

LEGENDA: Todos os receptores glutamatérgicos (NMDA, AMPA, cainato e metabotrópicos) quando ativados induzem nocicepção. Esta facilitação da transmissão nociceptiva ocorre via influxo de Ca^{+2} e Na^+ através dos receptores ionotrópicos, e exclusão de K^+ via receptores NMDA e AMPA. O aumento intracelular de Ca^{+2} é o principal responsável e desencadeador da nocicepção. A ativação dos receptores metabotrópicos resulta na ativação das vias da PLC, PKC, MEK kinases, AC, o que também resulta no aumento intracelular de Ca^{+2} e do AMPc. O eugenol, através de ensaios farmacológicos, demonstra bloquear a ativação destes 4 tipos de receptores glutamatérgicos, reduzindo a nocicepção.

Os efeitos do eugenol sobre a nocicepção induzida por glutamato e pelos agonistas glutamatérgicos permitiu-nos fazer outros questionamentos sobre o mecanismos de ação deste fenilpropano, pois nos últimos anos têm sido relatado e demonstrado por diferentes pesquisadores uma relação entre os canais TRPs e o neurotransmissor glutamato, mais especificamente o canal TRPV1 (KIM et al., 2011;

MEDVEDEVA; KIM ; USACHEV , 2008). Sendo assim, levantou-se a hipótese de que o efeito antinociceptivo do eugenol também poderia estar de alguma forma envolvido com uma modulação negativa dos canais TRPs que, quando ativados, também irão promover nocicepção (STORY et al., 2003). Os canais TRPs mais estudados até o momento em relação à dor são o TRPV1, TRPA1 e TRPM8. Apesar das várias evidências do papel dos canais TRPV1 na transmissão da dor na medula espinal, os mecanismos que contribuem para este processo ainda não estão totalmente claros. Sabe-se, por exemplo, que o TRPV1 medeia a transmissão pré-sináptica na medula espinal (GUO et al., 1999; HWANG et al., 2000). Assim, demonstrou-se que a estimulação de aferentes primários com endovanilóides ou capsaicina foi capaz de facilitar a liberação de CGRP, SP e glutamato (HUANG et al., 2002; TOGNETTO et al., 2001). Estes dados são suportados por Fiorentino; Cairns; Hu (1999), que demonstraram a localização de receptores funcionais de TRPV1 em tecidos profundos craniofaciais, e que eles podem ser modulados por receptores periféricos de glutamato. Outros achados importantes demonstraram que antagonistas NMDA e não-NMDA foram capazes de bloquear o aumento do disparo neuronal induzido por capsaicina e que esta aumentou a transmissão sináptica glutamatérgica excitatória sem afetar a transmissão sináptica GABAérgica inibitória (KIM et al., 2011).

Assim, dada a relação próxima entre os receptores TRPs e o sistema glutamatérgico e tendo em vista os resultados já obtidos com relação ao envolvimento do sistema glutamatérgico na ação antinociceptiva do eugenol, o próximo passo deste trabalho foi investigar se este efeito do eugenol também estaria envolvido com os canais TRPs, o qual poderia sugerir que parte do efeito do eugenol sobre o sistema glutamatérgico, poderia ser mediado por uma inibição da atividade dos canais TRPs. Assim, dada a relevância básica e clínica, torna-se pertinente avaliar especificamente contribuição dos canais TRP no modelo animal de dor orofacial padronizado neste trabalho.

A capsaicina (agonista dos canais TRPV1) pode ativar (LIU; SIMON, 1994, 1996, 2003) e sensibilizar aferentes trigeminais (STRASSMAN; RAYMOND; BURSTEIN, 1996), e ainda excitar neurônios nociceptivos do tronco encefálico (CARSTENS; KUENZLER; HANDWERKER, 1998; ZANOTTO et al., 2007). Além disso, a injeção de capsaicina na ATM de ratos induz de forma dependente da dose uma atividade muscular na mandíbula, produzindo uma sensibilização central dos neurônios nociceptivos do tronco cerebral (TANG; HAAS; HU, 2004). Ainda, a capsaicina é capaz de

produzir uma resposta inflamatória no interior destes tecidos que pode ser bloqueada por antagonistas dos receptores TRPV1 (HU et al., 2004). Estudos em humanos, demonstraram que a injeção de capsaicina em regiões craniofaciais também pode induzir hiperalgesia secundária, alodínia e dor muscular na mandíbula associada a alterações na função motora (GAZERANI; ARENDT-NIELSEN, 2005; GAZERANI et al., 2006; SOHN et al., 2000; WANG; ARENDT-NIELSEN; SVENSSON, 2002).

Com relação a estudos clínicos, sabe-se que a injeção de capsaicina intramuscular em humanos ativa nociceptores musculares e induz uma sensação de dor profunda e intensa, bem como hiperalgesia mecânica (ARIMA; SVENSSON; ARENDT-NIELSEN, 2000, ARIMA et al., 2009). Em ratos, a injeção de capsaicina no músculo masseter evoca hipersensibilidade mecânica (RO et al., 2007), sugerindo que os canais TRPV1 que estão expressos em aferentes do masseter sejam funcionais na dor orofacial. Da mesma forma, as injeções no masséter de um agonista TRPA1, o óleo de mostarda, evoca uma resposta nociceptiva e inflamação dependente da dose em roedores (RO et al., 2003; LEE et al., 2006). Além disso, recentes estudos demonstraram implicação dos receptores de glutamato e dos canais TRPV1 periféricamente localizados como responsáveis em parte pela hipersensibilidade do músculo masséter (ARENDT-NIELSEN et al., 2008; RO et al., 2006). Em neurônios do GRD, a ativação do receptor de glutamato metabotrópico 5 (mGluR5) leva a um aumento da sensibilidade térmica, aumentando a função do TRPV1 através de uma via de sinalização dependente do AMPc intracelular (HU et al., 2005).

Corroborando com os resultados da literatura, os nossos dados demonstram a participação do canal TRPV1 na dor orofacial, já que a injeção de capsaicina no masséter de camundongos induziu a um comportamento nociceptivo nestes animais de forma dependente da dose, o que sugere que o modelo padronizado neste estudo foi sensível à capsaicina, e além disso, também indica que o receptor TRPV1 está claramente envolvido na dor orofacial. Além disso, outro dado que confirma e estende nossas conclusões, foi o experimento no qual a capsazepina, antagonista seletivo de TRPV1, foi capaz de bloquear totalmente a resposta nociceptiva induzida pela capsaicina. Assim, concluímos que nosso modelo é sensível ao componente algogênico capsaicina, e que este mecanismo claramente depende do receptor TRPV1. No próximo passo deste estudo, avaliamos a capacidade do eugenol reduzir a nocicepção induzida pela capsaicina. O eugenol bloqueou parcialmente a nocicepção induzida pela capsaicina, e quando

coadministrado com a capsazepina em doses subativas, também reduziu a nocicepção. Estes dados tornam claras as evidências de que o eugenol bloqueia, direta ou indiretamente o receptor TRPV1 causando antinocicepção. Além disso, torna-se relevante salientar a relação dos canais TRP, principalmente o receptor TRPV1 e sua interrelação com o sistema glutamatérgico. Como mencionado anteriormente, a ativação do TRPV1 induz a liberação de glutamato (MEDVEDEVA; KIM; USACHEV, 2008), portanto, o bloqueio deste receptor pode reduzir a nocicepção induzida por este aminoácido. Com base nos resultados aqui apresentados pode-se sugerir também, que pelo menos em parte, o efeito do eugenol sobre a nocicepção induzida pelo glutamato e por outros agonistas glutamatérgicos, pode ocorrer devido à redução da liberação de glutamato via bloqueio do receptor TRPV1.

Em seguida, foi realizada a avaliação do possível envolvimento do canal TRPA1, que quando ativado pode facilitar a neurotransmissão da nocicepção (RO et al., 2003). Alguns autores demonstraram que injeções de óleo de mostarda e capsaicina no músculo masséter de ratos produziu respostas nociceptivas de uma forma dependente da dose, demonstrando que estes algógenos são capazes de induzir hiperalgesia mecânica, e que este fenômeno é causado pela ativação dos canais TRPV1 e TRPA1, respectivamente (LEE et al., 2006; RO et al., 2003). Estes dados foram confirmados através do uso de antagonistas seletivos para estes canais, o que evidenciou seu papel no processamento da dor muscular craniofacial. Ainda, estes autores demonstraram que ambos os canais TRPV1 e TRPA1 podem ser recrutados e sensibilizados através de distintas vias intracelulares por vários mediadores inflamatórios, que além de poder induzir dor muscular geral podem contribuir para a hiperalgesia mecânica no tecido muscular. Assim sendo, a compreensão dos mecanismos pelos quais esses receptores pró-nociceptivos induzem a hipersensibilidade mecânica no tecido muscular é de grande importância clínica, principalmente na área odontológica.

Baseando-se em estudos na literatura que demonstram a localização dos canais TRPA1 na região orofacial, e sabendo que a ativação deste receptor também é capaz de induzir nocicepção, utilizamos substâncias seletivas sobre este receptor para podermos avaliar de forma mais específica o seu envolvimento. Assim como nos experimentos onde avaliamos a participação do receptor TRPV1, inicialmente testamos se um ativador direto dos canais TRPA1 poderia promover nocicepção muscular orofacial. Deste modo demonstramos que a injeção de cinamaldeído, agonista do receptor TRPA1, foi capaz de induzir um comportamento nociceptivo no masseter dos

camundongos, e ainda, que este efeito foi parcialmente bloqueado quando os animais foram pré-tratados com cânfora, um bloqueador seletivo do receptor TRPA1 (INOUE et al., 2012). Neste caso, foi observado que o eugenol foi mais uma vez eficaz na prevenção da nocicepção, e que quando coadministrado com cânfora, em doses subativas, reduziu a nocicepção da mesma forma. Este resultado, somado aos resultados anteriores, onde o eugenol também bloqueou o comportamento nociceptivo induzido por outro agonista TRP, sugerem um efeito ubíquo deste fenilpropano, pois parece se tratar de uma substância não-seletiva, com afinidade semelhantes para diferentes canais TRPs. Ainda, o bloqueio do efeito dos agonistas glutamatérgicos e TRPs pelo eugenol aqui apresentado sugere que ele seja uma molécula com capacidade de atuar em diferentes sítios e ao mesmo tempo produzir efeito antinociceptivo, com uma possível interação entre esses dois sistemas. A Figura 18 demonstra a possível interação entre o sistema glutamatérgico e os canais TRPs e sugere a maneira pelo qual o eugenol possa estar exercendo seu efeito antinociceptivo direta ou indiretamente sobre os canais TRPs. Esta característica reforça a recomendação de seus estudos e de novas pesquisas, pois possui um perfil desejado para novas drogas analgésicas, principalmente que possam ser úteis no tratamento das dores orofaciais. Uma característica bastante marcante em muitos pacientes portadores desta patologia, é a sensibilidade ao frio. Em comparação à dor relacionada ao calor, os mecanismos envolvidos na percepção ao frio e hipersensibilidade estão pouco claros até o presente momento (ALLCHORNE; BROOM; WOOLF , 2005). A maior parte das pesquisas relacionadas com a nocicepção induzida pelo frio têm utilizado como metodologia principalmente estudos in vitro e imunoistoquímicos, havendo poucos estudos comportamentais disponíveis (ROSSI et al., 2006). A Figura 18 demonstra a possível interação entre o sistema glutamatérgico e canais TRPs e sugere a maneira pelo qual o eugenol possa estar exercendo seu efeito antinociceptivo direta ou indiretamente sobre os canais TRPs.

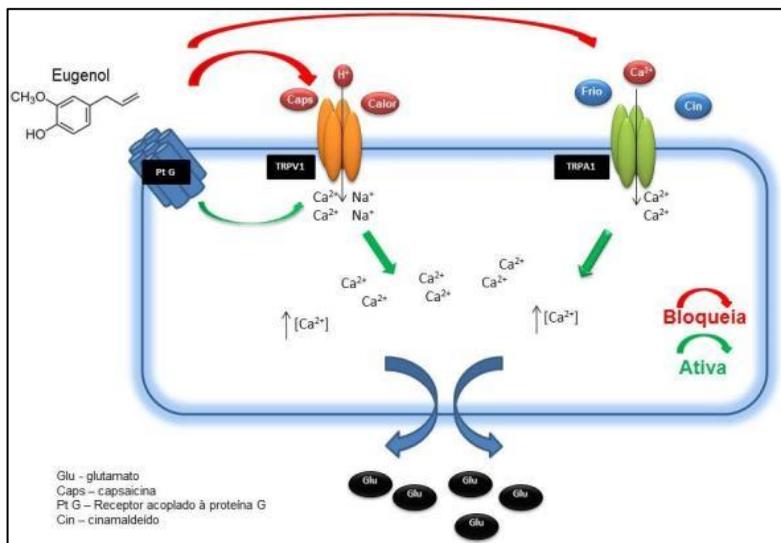


Figura 18: Possível interação dos canais TRPs com o glutamato no efeito antinociceptivo do eugenol.

LEGENDA: A ativação dos canais TRPs, principalmente TRPV1 e TRPA1, induzem a um considerável aumento intracelular dos níveis de Ca^{2+} . Esta elevação de Ca^{2+} facilita e intensifica a liberação do glutamato, o que resulta na facilitação da transmissão nociceptiva. Os resultados deste trabalho sugerem que o efeito antinociceptivo do eugenol pode se dar também através de um mecanismo indireto, via bloqueio dos canais TRPs, com consequente redução da liberação do glutamato.

O teste comportamental de nociceção ao frio com acetona tem sido utilizado para avaliar a alodínia, entretanto, se torna difícil saber exatamente qual a temperatura exata que a acetona é capaz de induzir a nociceção (CARLTON, 2001), e além disso, existe uma dificuldade de interpretar a diferença entre as sensações mecânica e de frio que o animal possa apresentar (ROSSI et al., 2006). O TRPM8 é o principal receptor ao frio em aferentes primários que possui como agonista o mentol, que é um ativador químico dessa sensação (MCKEMY, NEUHAUSSER; JULIUS, 2002). Este receptor funciona como um mediador molecular que é ativado por temperaturas abaixo de 25°C (PEIER et al., 2002). Infelizmente tem-se avançado pouco nesta área nos últimos anos, devido a dificuldade de obtenção de modelos animais de dor ao frio translacionáveis à realidade da dor em humanos. Ainda, com relação a estimulação facial ao frio, não se

obteve efeitos significantivos em modelos animais que utilizem temperaturas superiores a -4°C .

De forma geral, baixas temperaturas não causam dano tecidual imediatamente como o calor nocivo, além disso, os animais podem ser mais tolerantes aos desconfortos iniciais se motivados por recompensas alimentares. Várias populações de aferentes primários têm sido identificadas como responsáveis pela percepção ao frio e expressam diferentes canais da família dos TRPs. O canal TRPM8 é o receptor expresso nesses neurônios sensoriais (STORY et al., 2003). Estudos demonstraram que após tratamento com mentol na região orofacial, houve um aumento significativo do comportamento de alodínia bem como a sensibilização periférica das fibras neuronais. Provavelmente, tanto as fibras A δ como fibras C expressam o receptor TRPM8 na região orofacial, e estas respondem ao frio (KOBAYASHI et al., 2005), entretanto, tem sido observado que a temperatura de 24°C pode não ser suficiente para ativar os receptores TRPM8 presentes nas fibras C, mas sim nas fibras A δ , que tiveram uma ativação semelhante à ativação induzida pelo mentol (LI et al., 2007).

Com base nessas afirmações, fica evidente a importância de avaliar a participação dos canais TRPM8 na dor muscular orofacial. As avaliações foram realizadas apenas por ativação química, justamente em virtude do viés apresentado pelos testes térmicos. Desta forma, foram utilizados agonistas e antagonistas seletivos para o TRPM8. A injeção de mentol foi utilizada para induzir o comportamento nociceptivo no músculo masseter de camundongos. Neste estudo, foi a primeira vez que um dos agentes algogênicos utilizados não causou um efeito dependente da dose, pois somente a dose de 10 nmol/sítio foi capaz de induzir efeito nociceptivo. No entanto, este efeito parece ser realmente em virtude da ativação do TRPM8, pois o vermelho de rutênio, antagonista do canal TRPM8, preveniu parcialmente o efeito causado pelo agonista. Além disso, mais uma vez o eugenol foi capaz de reverter o efeito nociceptivo, e com uma eficácia semelhante à do vermelho de rutênio. Por último, quando avaliado em sinergia, juntos o vermelho de rutênio e o eugenol, apresentaram um efeito maior do que quando avaliados separadamente. Sabendo-se que a hipersensibilidade ao frio é uma das queixas apresentadas pelos pacientes portadores de DTM, este efeito apresentado pelo eugenol possui um potencial promissor, pois será de grande valia se em futuros estudos clínicos este apresentar efeitos semelhantes a este quando testado em pacientes portadores de DTMs.

Como já mencionado, apesar de não haver uma direta relação entre as dores provocadas por distúrbios temporomandibulares e processos

inflamatórios, sabe-se da íntima relação entre ativação de receptores glutamatérgicos e liberação de neuropeptídeos (SEYBOLD, 2009). Neuropeptídeos como SP e CGRP podem causar pequenos processos inflamatórios quando liberados localmente (SACERDOTE; LEVRINI, 2012). Sabendo-se que a dor induzida pelo modelo animal que padronizamos neste trabalho que envolveu ativação de receptores glutamatérgicos foi bloqueada pelo eugenol; e que substâncias pró-inflamatórias, como neuropeptídeos, levam à produção de prótons, avaliamos o potencial do eugenol em modelo de dor induzida pela injeção de substância ácida.

Nas terminações nervosas nociceptivas, existem entidades moleculares específicas para detectar sinais químicos ácidos, os receptores ASICs (sensíveis a prótons H^+). Os canais iônicos sensíveis a ácido (ASICs), como já mencionado na introdução, são codificados por quatro diferentes genes e produzem 4 subunidades, ASIC1, ASIC2, ASIC3 e ASIC4. Os ASICs são trímeros de proteínas e podem ser compostos de diferentes combinações destas subunidades (WANG; ARENDT-NIELSEN; SVENSSON, 2002). Após sua descoberta, estes canais ficaram conhecidos como os principais sensores de prótons extracelulares. Normalmente, uma fração significativa dos neurônios do GRD de ratos exibem correntes transitórias semelhante à ativação do ASIC em resposta aos prótons, por outro lado, em camundongos transgênicos expressando uma forma dominante negativa ASIC3, nenhum dos neurônios exibiu correntes transitórias semelhante ao ASIC (MOGIL et al., 2005). Surpreendentemente, em testes comportamentais, verificou-se que os camundongos transgênicos são mais sensíveis para um número de modalidades de dor do que os camundongos selvagens (MOGIL et al., 2005).

Por fim, considerando a possibilidade da indução da nocicepção por soluções ácidas, e clinicamente considerando a liberação de prótons em quadros de inflamação, a última abordagem experimental foi avaliar um possível efeito antinociceptivo do eugenol sobre a nocicepção induzida por salina acidificada. Neste caso, demonstramos que a injeção de salina acidificada no masséter de camundongos, igualmente ao que ocorreu com a injeção de agonistas glutamatérgicos e agonistas dos canais TRPs, induziu um comportamento nociceptivo nos animais. Além disso, da mesma forma como para os outros testes, o eugenol apresentou efeito antinociceptivo expressivo contra a dor induzida por salina acidificada quando isoladamente administrado, bem como quando realizada sua coadministração com doses subativas de amilorida (bloqueador de canais de sódio).

O efeito promovido pelo eugenol sobre os receptores ASICs, é menos claro que os outros efeitos, pois não podemos concluir ou sugerir

como realmente o eugenol possa reduzir esta nocicepção, se atuando diretamente em canais como o TRPV1, ou através de algum efeito químico de neutralização dos prótons extracelulares. A falta de estudos na literatura com relação a participação destes receptores na dor orofacial, em especial nas dores musculares, sugere que este receptor seja alvo de novas pesquisas. Assim, nossos resultados sugerem que o eugenol pode estar agindo direta ou indiretamente sobre estes receptores e assim promovendo seu efeito antinociceptivo, contudo novas pesquisas são necessárias no intuito de verificar a especificidade destes receptores no processo da dor muscular orofacial. A Figura 19 denota os prováveis mecanismos de ação antinociceptiva do eugenol envolvendo os canais TRPs e ASICs.

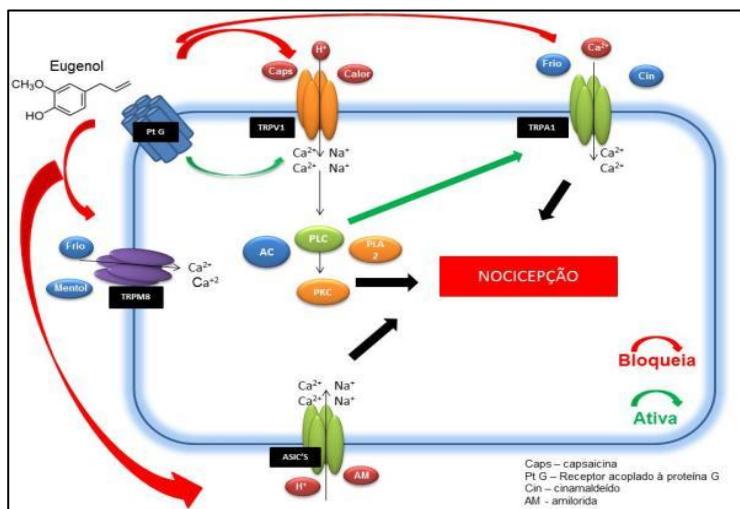


Figura 19: Prováveis mecanismos de ação antinociceptiva do eugenol envolvendo os canais TRPs e ASICs.

LEGENDA: Os canais TRPs (TRPA1, TRPV1 e TRPM8) quando ativados pelas substâncias capsaicina, cinamaldeído e mentol, respectivamente, induzem nocicepção. Além disso, calor nocivo e prótons H^+ também ativam o canal TRPV1. O canal TRPA1 também é ativado por Ca^{2+} extracelular e frio nocivo. O TRPM8 é sensível também ao frio nocivo. Todos os 3 quando ativados permitem a entrada de Ca^{2+} , além do TRPV1 também permitir a entrada de Na^+ e ativa as vias de AC, PLC e PLA2. Os canais ASICs são ativados por prótons H^+ . O aumento intracelular de Ca^{2+} e a ativação da proteína PKC, são os principais mecanismos desencadeadores de nocicepção. Os resultados do presente estudo demonstraram que o eugenol, bloqueia a ativação destes 3 tipos de canais TRPs, além de bloquear os canais ASICs, induzindo efeito antinociceptivo.

7 CONCLUSÕES

O presente estudo demonstra que a injeção de glutamato, dos agonistas específicos de seus receptores, bem como dos agonistas dos receptores TRPs e ASICs induzem nocicepção muscular orofacial quando injetados no músculo masséter de camundongos. Este modelo de nocicepção muscular orofacial padronizado em camundongos mimetiza o sintoma mais comum observado nos pacientes portadores de disfunção temporomandibular muscular, o que o torna extremamente útil para a realização de estudos pré-clínicos que busquem avaliar e estudar esta condição clínica. O eugenol possui potencial terapêutico para o tratamento de dores oriundas de disfunções temporomandibulares e que, pelo menos em parte, a atividade antinociceptiva do eugenol se dá pelo bloqueio da ativação dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos e não-ionotrópicos, além dos receptores TRPs e ASICs, com uma possível interação entre esses sistemas. Ainda, a associação de doses subativas de eugenol com os antagonistas glutamatérgicos, TRPs e ASICs promoveram efeito antinociceptivo e sinérgico no modelo de dor muscular orofacial. Com base nos resultados obtidos, podemos inferir que as infiltrações intramusculares de eugenol isoladamente ou em associação com substâncias antagonistas glutamatérgicas e dos receptores TRPs e ASICs podem se tornar boas alternativas de tratamento para as crises dolorosas nos casos de DTMs musculares.

REFERÊNCIAS

AHERN, G. P. Activation of TRPV1 by the satiety factor oleoylethanolamide. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 278, n. 33, p. 30429-30434, 2003.

AKOPIAN, A. N. et al. A new member of the acid-sensing ion channel family. **Neuroreport**, London, v.11, n. 10, p. 2217-2222, 2000.

ALLCHORNE, A. J.; BROOM, D. C.; WOOLF, C. J. Detection of cold pain, cold allodynia and cold hyperalgesia in freely behaving rats. **Mol. Pain**, London, v. 1, p. 36, 2005.

ALLEN, N. J.; ATTWELL, D. Modulation of ASIC channels in rat cerebellar Purkinje neurons by ischaemia-related signals. **J. Physiol.** , Oxford, v. 543, p. 521-529, 2002.

ALVAREZ DE LA ROSA, D. et al. Functional implications of the localization and activity of acid-sensitive channels in rat peripheral nervous system. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, Washington, v. 99, n. 4, p. 2326-31, 2002.

AOSHIMA, H.; HAMAMOTO, K. Potentiation of GABAA receptors expressed in *Xenopus* oocytes by perfume and phytoncid. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, Tokyo, v. 63, p.743-748, 1999.

ARENDRT-NIELSEN, L. et al. Interactions between glutamate and capsaicin in inducing muscle pain and sensitization in humans. **Eur. J. Pain**, London, v. 12, p. 661-70, 2008.

ARIJI, Y. et al. Masseter muscle sonographic features as indices for evaluating efficacy of massage treatment. **Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, v. 110, n. 4, p. 517-2, 2010.

ARIMA, T.; SVENSSON, P.; ARENDT-NIELSEN, L. Capsaicin-induced muscle hyperalgesia in the exercised and non-exercised human masseter muscle. **J. Orofac. Pain**, Carol Stream, Ill, v. 14, n. 3, p. 213-223, 2000.

ARIMA, T. et al. Effect of capsaicin-evoked jaw-muscle pain on intramuscular blood-flow. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 54, n. 3, p. 241-9, 2009.

BACHIEGA, T. F. et al. Clove and eugenol in noncytotoxic concentrations exert immunomodulatory/anti-inflammatory action on cytokine production by murine macrophages. **J. Pharm. Pharmacol.**, London, v. 64, n. 4, p. 610-616, 2012.

BANDELL, M. et al. Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. **Neuron.**, Cambridge, Mass, v. 41, n. 6, p. 849-57, 2004.

BANG, S. et al. Transient receptor potential A1 mediates acetaldehyde-evoked pain sensation. **Eur. J. Neurosci.**, Oxford, v. 26, n. 9, p. 2516-23, 2007.

BATTAGLIA, G.; RUSTIONI, A. Coexistence of glutamate and substance P in dorsal root ganglion neurons of the rat and monkey. **J. Comp. Neurol.**, Philadelphia, v. 277, n. 2, p. 302-12, 1988.

BAUTISTA, D. M. et al. Pungent products from garlic activate the sensory ion channel TRPA1. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, Washington, v.102, n. 34, p.12248-12252, 2005.

BAUTISTA, D. M. et al. TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. **Cell**, Cambridge, Ma, v. 124, n. 6, p. 1269-1282, 2006.

BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A. **Neurociências: desvendando o sistema nervoso**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

BEIRITH, A.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. Mechanisms underlying the nociception and paw edema caused by injection of glutamate into the mouse paw. **Brain Res.**, Amsterdam , v. 924, n. 2, p. 219-228, 2002.

BENSON, C. J. et al. Heteromultimers of DEG/ENaC subunits form H⁺-gated channels in mouse sensory neurons. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, Washington, v. 99, n. 4, p. 2338-2343, 2002.

BESSON, M. J. The complexity of physiopharmacologic aspects of pain. **Drugs**, New York, v. 53, Supp. 2, p. 1-9, 1999.

BESSON, M. J.; DICKENSON, A. **The pharmacology of pain**. Berlin: Springer-Verlag, 1997.

BEVAN, S.; YEATS, J. Protons activate a cation conductance in a subpopulation of rat dorsal root ganglion neurones. **J. Physiol.**, Oxford, v. 433, p. 145-161, 1991.

BEVILACQUA-GROSSI, D. et al. Anamnestic index severity and signs and symptoms of TMD. **Cranio**, Chattanooga, Tenn , v. 24, n. 2, p. 112-118, 2006.

BIRKLEIN, F.; SCHMELZ, M. Neuropeptides, neurogenic inflammation and complex regional pain syndrome (CRPS). **Neurosci. Lett.**, Amsterdam , v. 437, n. 3, p. 199-202, 2008.

BOEVER, J. A. Functional disturbances of temporomandibular joints. **Oral Sci. Rev.**, Copenhagen, v. 2, p. 100-117, 1973.

CAIRNS, B. E.; SESSLE, B. J.; HU, J.W. Evidence that excitatory amino acid receptors within the temporomandibular joint region are involved in the reflex activation of the jaw muscles. **J. Neurosci.**, Washington , v. 18, n. 19, p. 8056-64, 1998.

CAIRNS, B. E. et al. Sex-related differences in human pain and rat

afferent discharge evoked by injection of glutamate into the masseter muscle. **J. Neurophysiol.**, Washington, v. 86, n. 2, 2, p. 782-91, 2001a.

CAIRNS, B. E.; SESSLE, B. J.; HU, J. W. Characteristics of glutamate-evoked temporomandibular joint afferent activity in the rat. **J. Neurophysiol.**, Washington, v. 85, n. 6, p. 2446-2454, 2001b.

CAIRNS, B. E. et al. Glutamate-induced sensitization of rat masseter muscle fibers. **Neuroscience**, Oxford, v. 109, n. 2, p. 389-99, 2002.

CALIXTO, J. B. et al. Contribution of natural products to the discovery of the transient receptor potential (TRP) channels family and their functions. **Pharmacol Ther.**, Oxford, v. 106, n. 2, p. 179-208, 2005.

CAPRA, N. F.; DESSEM, D. Central connections of trigeminal primary afferent neurons: Topographical and functional considerations. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, Boca Raton, v. 4, n.1, p. 1-52, 1992.

CAPRA, N. F.; RO, J. Y. Human and animal experimental models of acute and chronic muscle pain: intramuscular algescic injection. **Pain**, Amsterdam, v.110, n. 1-2, p. 3-7, 2004.

CARLSSON, G. E. Epidemiology and treatment need for temporomandibular disorders. **J. Orofac. Pain**, Carol Stream, Ill, v. 13, p. 232-237, 1999.

CARLSSON, G. E.; LERESCHE, L. Epidemiology of temporomandibular disorders. In: SESSLE, B. J.; BRYANT, P. S.; DIONNE, R. A., (Ed.). **Temporomandibular Disorders and Related Pain Conditions**. Seattle: IASP Press, 1995. p. 211-226.

CARLTON, S. M. Peripheral excitatory amino acids. **Curr. Opin. Pharmacol.**, Oxford, v.1, p. 52-56, 2001.

CARLTON, S. M.; COGGESHALL, R. Nociceptive integration: does it have a peripheral component? **J. Pain**, Washington, v. 7, p. 71-78, 1998.

CARSTENS, E.; KUENZLER, N.; HANDWERKER, H. O. Activation of neurons in rat trigeminal subnucleus caudalis by different irritant chemicals applied to oral or ocular mucosa. **J. Neurophysiol.**, Washington, v. 80, p. 465-492, 1998.

CASTRILLON, E. E. et al. Glutamate-evoked jaw muscle pain as a model of persistent myofascial TMD pain? **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 53, p. 666-676, 2008.

CATERINA, M. J. et al. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, London, v. 389, n. 6653, p. 816-24, 1997.

CATERINA, M. J. et al. A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. **Nature**, London, v. 398, n. 6726, p. 436-441, 1999.

CATERINA, M. J. et al. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. **Science**, New York, v. 288, n. 5464, p. 306-313, 2000.

CATERINA, M. J.; JULIUS, D. The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. **Annu. Rev. Neurosci.**, Palo Alto, Calif, v. 24, p. 487-517, 2001.

CHAIIEB, K. et al. The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): a short review. **Phytother. Res.**, London, v. 21, n. 6, p. 501-506, 2007.

CHAUDHARY, P.; MARTENSON, M. E.; BAUMANN, T. K. Vanilloid receptor expression and capsaicin excitation of rat dental primary afferent neurons. **J. Dent. Res.**, Chicago, v. 80, n. 6, p. 1518-1523, 2001.

CHEN, C. C. et al. A sensory neuron-specific, proton-gated ion channel. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, Washington, v. 95, p. 10240-10245, 1998.

CHIDIAC, J. J. et al. Nociceptive behaviour induced by dental application of irritants to rat incisors: a new model for tooth inflammatory pain. **Eur. J. Pain**, London, v. 6, n.1, p. 55-67, 2002.

CHO, J. S. et al. Effects of eugenol on Na⁺ currents in rat dorsal root ganglion neurons. **Brain Res.**, Amsterdam, v. 1243, p. 53-62, 2008.

CHU, C. J. N-oleoyldopamine: a novel endogenous capsaicin-like lipid that produces hyperalgesia. **J. Biol. Chem.**, Berlin, v. 278, p. 13633-13639, 2003.

CHUANG, H. H. et al. Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P₂-mediated inhibition. **Nature**, London, v. 411, n. 6840, p. 957-62, 2001.

CHUN, Y. H. et al. Peripheral AMPA receptors contribute to muscle nociception and c-fos activation. **Neurosci. Res.**, New York, v. 62, n. 2, p. 97-104, 2008.

CHUNG, G. et al. Modulation of CaV2.3 calcium channel currents by eugenol. **J. Dent. Res.**, Chicago, v. 87, p. 137-141, 2008.

CLAPHAM, D. E. TRP channels as cellular sensors. **Nature**, London, v. 46, p. 517-24, 2003.

CLARK, G.T. Etiologic theory and the prevention of temporomandibular disorders. **Adv. Dent. Res.**, Washington, v. 5, p. 60-66, 1991.

CLARK, G.T.; SOLBERG, W. K.; MONTEIRO, A. A. Temporomandibular disorders: New challenges in clinical management, re- search, and teaching. In: CLARK, G. T.; SOLBERG, W. K. (Ed.). **Perspectives in Temporomandibular Disorders**. Chicago, IL:

Quintessence, 1987. p. 13-26.

CLAUW, D. J.; CROFFORD, L. J. Chronic widespread pain and fibromyalgia: what we know, and what we need to know. **Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.** Amsterdam, v. 17, n. 4, p. 685-701, 2003.

COLLIER, H. O. J. et al. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **Br. J. Pharmacol. Chemother.** London, v. 32, n. 2, p. 295-310, 1968.

CONN, P. J.; PIN, J. P. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, Palo Alto, Calif, v. 37, p. 205-37, 1997.

CONTI, P. C. et al. Behavioural changes and occlusal splints are effective in the management of masticatory myofascial pain: a short-term evaluation. **J. Oral. Rehabil.**, Oxford, v. 39, n. 10, p. 754-60, 2012.

DAI, Y. et al. Sensitization of TRPA1 by PAR2 contributes to the sensation of inflammatory pain. **J. Clin. Invest.**, New Haven, v. 117, n. 7, p. 1979-87, 2007.

DAL BÓ W. et al. Eugenol reduces acute pain in mice by modulating the glutamatergic and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) pathways. **Fundam. Clin. Pharmacol.**, Paris, 2012..

DANTAS, A. M. **Os nervos cranianos**: estudo anatomoclínico. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

DAVIS, J. B. et al. Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. **Nature**, London, v. 405, n. 6783, p. 183-187, 2000.

DHAKA, A.; VISWANATH, V.; PATAPOUTIAN, A. TRP ion channels and temperature sensation. **Annu. Rev. Neurosci.** Palo Alto, Calif, v. 29, p. 135-61, 2006.

DE LEEUW R. **Orofacial Pain**: guidelines for assessment, diagnoses and management. Chicago: Quintessence, 2008.

DENUCCI, D. J.; DIONNE, R. A.; DUBNER, R. Identifying a neurobiologic basis for drug therapy in TMDs. **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, Ill, v. 127, n. 5, p. 581-93, 1996.

DEVANE, W. A. et al. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. **Science**, New York, v. 258, n. 5090, p. 1946-1949, 1992.

DIATCHENKO, L. et al. Catechol-O-methyltransferase gene polymorphisms are associated with multiple pain-evoking stimuli. **Pain**, Amsterdam, v. 125, n. 3, p. 216-224, 2006.

DIATCHENKO, L. et al. Genetic architecture of human pain perception. **Trends Genet.**, Amsterdam, v. 23, p. 605-613, 2007.

DOERNER, J. F. et al. Transient receptor potential channel A1 is directly gated by calcium ions. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 282, n. 18, p. 13180-9, 2007.

DRAY, A. Inflammatory mediators of pain. **Br. J. Anaesth.**, London, v. 75, p. 125-31, 1995.

DUBÉ, G. R.; ELAGOZ, A.; MANGAT, H. Acid sensing ion channels and acid nociception. **Curr. Pharm. Des.**, Schiphol, The Netherlands, v. 15, p. 1750-1766, 2009.

DWORKIN, S. F. Illness behavior and dysfunction: Review of concepts and application to chronic pain. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, Ottawa, v. 69, p. 662-671, 1991.

DWORKIN, S. F.; VON KORFF, M. R.; LERESCHE, L. Epidemiologic studies of chronic pain: A dynamic-ecologic perspective. **Ann. Behav. Med.**, Knoxville, TN, v. 14, p. 3-11, 1992.

DWORKIN, S. F.; VON KORFF, M. R.; LERESCHE, L. Multiple pains and psychiatric disturbance: An epidemiologic investigation. **Arch. Gen. Psychiatry**, Chicago, v. 47, p. 239-244, 1990.

EBERSBERGER, A. et al. Morphine, 5-HT₂ and 5-HT₃ receptor antagonists reduce c-fos expression in the trigeminal nuclear complex following noxious chemical stimulation of the rat nasal mucosa. **Brain Res.**, Amsterdam, v. 676, n. 2, p. 336-42, 1995.

ECCLES, R. Menthol and related cooling compounds. **J. Pharm. Pharmacol.**, London, v. 46, p. 618-30, 1994.

EHRMANN, E. H.; MESSER, H. H.; ADAMS, G. G. The relationship of intracanal medicaments to postoperative pain in endodontics. **Int. Endod. J.**, Oxford, v. 36, n. 12, p. 868-75, 2003.

FEHRENBACHER, J. C. et al. Capsaicin-evoked iCGRP release from human dental pulp: a model system for the study of peripheral neuropeptide secretion in normal healthy tissue. **Pain**, Amsterdam, v. 144, n. 3, p. 253-61, 2009.

FENG, J. et al. Microinjection of morphine into the thalamic nucleus submedialis depresses bee venom-induced inflammatory pain in the rat. **J. Pharm. Pharmacol.** London, v. 60, n. 10, p. 1355-1363, 2008.

FERNÁNDEZ-CARNERO, J. et al. Short-term effects of dry needling of active myofascial trigger points in the masseter muscle in patients with temporomandibular disorders. **J. Orofac. Pain**, Carol Stream, Ill, v. 24, p. 106-112, 2010.

FERNANDEZ-DE-LAS-PEÑAS, C. et al. Bilateral widespread mechanical pain sensitivity in myofascial temporomandibular disorder: Evidence of impairment in central nociceptive processing. **J. Pain**, Philadelphia, PA , v. 10, n. 11, p. 1170-1178, 2009.

FIORENTINO, P. M.; CAIRNS, B. E.; HU, J. W. Development of inflammation after application of mustard oil or glutamate to the rat temporomandibular joint. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 44, p. 27-32, 1999.

FISCHER, I. U; VON UNRUH, G. E.; DENGLER, H. J. The metabolism of eugenol in man. **Xenobiotica**, London, v. 20, n. 2, p. 209-22, 1990.

FONNUM, F. Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. **J. Neurochem.**, New York, v. 42, p. 1-11, 1984.

FRIED, I. Functional neuroimaging in presurgical localization of essential cortical processing zones. **Adv. Neurol.**, New York, v. 83, p. 297-303, 2000.

FRISCH, J.; BHASKAR, S. N. Tissue response to eugenol containing periodontal dressings. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 38, n. 5, p. 402-408, 1968.

FUNDYTUS, M. E. Glutamate receptors and nociception: Implications for the drug treatment of pain. **CNS Drugs**, Mairangi Bay, Auckland, N.Z, v. 15, n.1, 29-58, 2001.

GADOTTI, V. M. et al. Contribution of spinal glutamatergic receptors to the antinociception caused by agmatine in mice. **Brain Res.**, Amsterdam, v. 1093, n.1, p. 116-122, 2006.

GASIC, G. P.; HOLLEMANN, M. Molecular neurobiology of glutamate receptors. **Annu. Rev. Physiol.**, Palo Alto, Calif, v. 54, p. 507-536, 1992.

GAZERANI, P.; ARENDT-NIELSEN, L. The impact of ethnic differences in response to capsaicin-induced trigeminal sensitization. **Pain**, Amsterdam, v.117, n. 1/2, p. 223–229, 2005.

GAZERANI, P.; ANDERSEN, O. K.; ARENDT-NIELSEN, L. A human experimental capsaicin model for trigeminal sensitization. Gender-specific differences. **Pain**, Amsterdam, v. 118, n. 1/2, p. 155-63, 2005.

GAZERANI, P. et al. The effects of botulinum toxin type A on capsaicin-evoked pain, flare, and secondary hyperalgesia in an experimental human model of trigeminal sensitization. **Pain**, Amsterdam, v. 122, p. 315-325, 2006.

GIBBS, J. L.; HARGREAVES, K. M. Neuropeptide Y Y1 receptor effects on pulpal nociceptors. **J. Dent. Res.**, Chicago, v. 87, p. 948-52, 2008.

GIBBS, J. L.; MELNYK, J. L.; BASBAUM, A. I. Differential TRPV1 and TRPV2 channel expression in dental pulp. **J. Dent. Res.**, Chicago, v. 90, n. 6, p. 765-770, 2011.

GODDARD, G. et al. Acupuncture and sham acupuncture reduce muscle pain in myofascial pain patients. **J. Orofac. Pain**, Carol Stream, Ill , v. 16, n.1, p. 71-6, 2002.

GRAHAM, L. T. et al. Distribution of some synaptic transmitter suspects in cat spinal cord. **J. Neurochem.**, New York, v. 14, n. 4, p. 465-472, 1967.

GREEN, B. G.; HAYES, J. E. Individual differences in perception of bitterness from capsaicin, piperine and zingerone. **Chem. Senses**, London, v. 29, n.1, p. 53-60, 2004.

GREENE, C. S. et al. Temporomandibular disorders and science: A response to the critics. **J. Prosthet. Dent.**, St. Louis, v. 80, p. 214-215, 1998.

GREER, K. R.; HOYT, J. W. Pain: theory, anatomy, and physiology. **Crit. Care Clin.**, Philadelphia, v. 6, p. 227-34, 1990.

GRIFFIS, C.; COMPTON, P.; DOERING, L. The effect of pain on leucocyte cellular adhesion molecules. **Biol. Res. Nurs.**, Thousand Oaks, CA, v. 7, p. 297-312, 2006.

GUÉNETTE, S. A. et al. Pharmacokinetics of eugenol and its effects on thermal hypersensitivity in rats. **Eur. J. Pharmacol.**, Amsterdam, v. 562, n.1/2, p. 60-67, 2007.

GUÉNETTE, S. A. et al. Pharmacokinetics and anesthetic activity of eugenol in male Sprague-Dawley rats. **J. Vet. Pharmacol. Ther.**, Oxford, v. 29, n. 4, p. 265-70, 2006.

GYNTHER G.W. et al. Synovial inflammation in arthroscopically obtained biopsy specimens from the temporomandibular joint: a review of the literature and a proposed histologic grading system. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, Philadelphia, v. 56, n. 11, p. 1281–6, 1998.

GUO, A. et al. Immunocytochemical localization of the vanilloid receptor 1 (VR1): relationship to neuropeptides, the P2X3 purinoceptor and IB4 binding sites. **Eur. J. Neurosci.**, Oxford, v. 11, p. 946–958, 1999.

HAN, S. R. et al. Intramuscular administration of morphine reduces mustard-oil-induced craniofacial-muscle pain behavior in lightly anesthetized rats. **Eur. J. Pain**, London, v. 12, p. 361-70, 2008.

HAYASHI, H. Morphology of termination of small and large myelinated trigeminal primary afferent fibers in the cat. **J. Comp. Neurol.**, Philadelphia, v. 240, n.1, p. 71-89, 1985a.

HEDENBERG-MAGNUSSON, B.; ERNBERG, M.; KOPP, S.

Symptoms and signs of temporomandibular disorders in patients with fibromyalgia of the temporomandibular system. **Acta Odontol. Scand.**, Stockholm , v. 55, n. 6, p. 344-9, 1997.

HENRIKSSON, K. G.; SÖRENSEN, J. The promise of N-methyl-D-aspartate receptor antagonists in fibromyalgia. **Rheum. Dis. Clin. North Am.**, Philadelphia, v. 28, n. 2, p. 343-51, 2002.

HESSELAGER, M.; TIMMERMANN, D. B.; AHRING, P. K. pH dependency and desensitization kinetics of heterologously expressed combinations of acid-sensing ion channel subunits. **J. Biol. Chem.** , Baltimore, v. 279, n. 12, p. 11006-15, 2004.

HU, H. Z. et al. 2-aminoethoxydiphenyl borate is a common activator of TRPV1, TRPV2, and TRPV3. **J. Biol. Chem.**, San Francisco, CA , v. 279, p. 35741-35748, 2004.

HU, J. W. et al. TRPV1 receptor mechanisms involved in capsaicin-induced oedema in the temporomandibular joint region. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, Boca Raton, FL, v. 2, p. 241–248, 2005.

HUANG, S. M. et al. An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, Washington, v. 99, p. 8400-8405, 2002.

HUNT, S. P.; MANTYH, P. W. The molecular dynamics of pain control. **Nat. Rev. Neurosci.**, London, v. 2, n. 2, p. 83-91, 2001.

HWANG, S. W. et al. Direct activation of capsaicin receptor by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, Washington, v. 97, p. 6155-6160, 2000.

HYLDEN, J. L.; WILCOX, G. L. Intrathecal morphine in mice: a new technique. **Eur. J. Pharmacol.**, Amsterdam, v. 67, n. 2/3, p. 313–316, 1980.

- ICHIKAWA, H.; SUGIMOTO, T. The co-expression of ASIC3 with calcitonin gene-related peptide and parvalbumin in the rat trigeminal ganglion. **Brain Res.**, Amsterdam, v. 943, n. 2, p. 287-91, 2002.
- IKEDA, H.; TOKITA, Y.; SUDA, H. Capsaicin-sensitive A delta fibers in cat tooth pulp. **J. Dent. Res.**, Chicago, v. 76, p. 1341-1349, 1997.
- IKEDA, Y. et al. Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanoids in the acid-induced writhing responses of mice. **Life Sci.**, Oxford, v. 69, p. 2911–2919, 2001.
- INOUE, N. et al. Etodolac blocks the allyl isothiocyanate-induced response in mouse sensory neurons by selective TRPA1 activation. **Pharmacology**, Basel (Switzerland), v. 90, n.1/2, p. 47-54, 2012.
- IVANUSIC, J. J. et al. Peripheral N-methyl-d-aspartate receptors contribute to mechanical hypersensitivity in a rat model of inflammatory temporomandibular joint pain. **Eur. J. Pain.**, London, v. 15, n. 2, p. 179-85, 2011.
- JANSSENS, A.; VOETS, T. Ligand stoichiometry of the cold- and menthol-activated channel TRPM8. **J. Physiol.**, Oxford, v. 589, p. 4827-35, 2011.
- JOHN, M. T. et al. Oral health- related quality of life in patients with temporomandibular disorders. **J. Orofac. Pain**, Carol Stream, Ill. , v. 21, n.1, p. 46–54, 2007.
- JONES, N. G. et al. Acid-induced pain and its modulation in humans. **J. Neurosci.** , Baltimore, Md. , v. 24, n. 48, p. 10974-10979, 2004.
- JORDT, S. E. et al. Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. **Nature**, London, v. 427, n. 6971, p. 260-265, 2004.
- JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception.

Nature, London, v. 413, n. 6852, p. 203-210, 2001.

KAI-KAI, M. A.; HOWE, R. Glutamate-immunoreactivity in the trigeminal and dorsal root ganglia, and intraspinal neurons and fibres in the dorsal horn of the rat. **Histochem. J.**, London, v. 23, n. 4, p. 171-179, 1991.

KELLGREN, J. H. Observations on referred pain arising from muscle. **Clin. Sci.**, London, v. 3, p. 175-190, 1938.

KEW, J. N.; KEMP, J. A. Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. **Psychopharmacology**, Berlin, v. 179, n.1, p. 4-29, 2005.

KIM, H. Y. et al. Characterization of dental nociceptive neurons. **J. Dent. Res.**, Chicago, v. 90, p. 771-776, 2011.

KLASSER, G. D.; GREENE, C. S. The changing field of temporomandibular disorders: what dentists need to know. **J. Can. Dent. Assoc.**, Ottawa, Ont., v. 75, n.1, p. 49-53, 2009.

KOBAYASHI, K. et al. Distinct expression of TRPM8, TRPA1, and TRPV1 mRNAs in rat primary afferent neurons with adelta/c-fibers and colocalization with trk receptors. **J. Comp. Neurol.**, Philadelphia, v. 493, p. 596-606, 2005.

KOZAM, G. The Effect of eugenol on nerve transmission. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.**, St. Louis, v. 44, n. 5, 799, 1977.

KREBS, H. A. Metabolism of amino-acids: The synthesis of glutamine from glutamic acid and ammonia, and the enzymic hydrolysis of glutamine in animal tissues. **Biochem. J.**, London, v. 29, p. 1951-69, 1935.

LA TOUCHE, R. et al. Effectiveness of acupuncture in the treatment of temporomandibular disorders of muscular origin: a systematic review of

the last decade. **J. Altern. Complement. Med.**, v. 16, n. 1, p. 107-12, 2010.

LAM, D. K.; SESSLE, B. J.; HU, J. W. Glutamate and capsaicin-induced activation and peripheral sensitization in deep craniofacial trigeminal nociceptive primary afferents. **Neuroscience**, San Diego, 2004. Res. 294.6.

LAM, D. K. et al. Neural mechanisms of temporomandibular joint and masticatory muscle pain: A possible role for peripheral glutamate receptor mechanisms. **Pain Res. Manag.**, Oakville, Ont., v. 10, n. 3, p. 145-152, 2005.

LASKIN, D. M. Etiology of the pain-dysfunction syndrome. **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, Ill , v.79, n. 1, p. 147-53, 1969.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. W. Animal models of nociception. **Pharmacol. Rev.**, Baltimore, v. 4, p. 597-652, 2001.

LEE, M. H. et al. Eugenol inhibits calcium currents in dental afferent neurons. **J. Dent. Res.**, Chicago, v. 84, n. 9, p. 848-851, 2005.

LEE, H. J. et al. Peripheral mGluR5 antagonist attenuated craniofacial muscle pain and inflammation but not mGluR1 antagonist in lightly anesthetized rats. **Brain Res. Bull.**, Phoenix, N. , v. 70, n. 4/6, p. 378-85, 2006.

LEE, J.; RO, J. Y. Differential regulation of glutamate receptors in trigeminal ganglia following masseter inflammation. **Neurosci. Lett.**, Amsterdam, v. 421, n. 2, p. 91-95, 2007.

LERESCHE, L. Epidemiology of temporomandibular disorders: Implications for the investigation of etiologic factors. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, Boca Raton, FL, v. 8, n. 3, p. 291-305, 1997.

LI, H. Y. et al. Eugenol inhibits K⁺ currents in trigeminal ganglion

neurons. **J. Dent. Res.**, Chicago, v. 86, n. 9, p. 898-902, 1998.

LI, J. et al. A 15-day oral dose toxicity study of aspirin eugenol ester in Wistar rats. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v. 50, n. 6, p. 1980-1985, 2012.

LIONNET, L.; BEAUDRY, F.; VACHON, P. Intrathecal eugenol administration alleviates neuropathic pain in male Sprague–Dawley rats. **Phytother Res.**, London, v. 24, n.11, p. 1645-1653, 2010.

LIU, L.; SIMON, S. A. Capsaicin-induced currents with distinct desensitization and Ca²⁺ dependence in rat trigeminal ganglion cells. **J. Neurophysiol.**, Washington, v. 75, n. 4, p. 1503-1514, 1996.

LIU, L.; SIMON, S. A. Modulation of IA currents by capsaicin in rat trigeminal ganglion neurons. **J. Neurophysiol.**, Washington, v. 89, n. 3, 1387-1401, 2003.

LIU, L.; SIMON, S. A. A rapid capsaicin-activated current in rat trigeminal ganglion neurons. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, Washington, v. 91, p. 738-741, 1994.

LOCKER, D.; SLADE, G. Prevalence of symptoms associated with temporomandibular disorders in a Canadian population. **Community Dent. Oral Epidemiol.**, Copenhagen, v. 16, n. 5, p. 310-316, 1988.

LOESER, J. D.; MELZACK, R. Pain: an overview. **Lancet**, London, v. 353, n. 9164, p. 1607-1609, 1999.

LOESER, J. D.; TREEDE, R. D. The Kyoto protocol of IASP basic pain terminology. **Pain**, Amsterdam, v. 137, n. 3, p. 473-7, 2008.

LUND, J. P. et al. The pain-adaptation model: a discussion of the relationship between chronic musculoskeletal pain and motor activity. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, Ottawa, v. 69, n. 5, p. 683-94, 1991.

MACFARLANE, T.V.; GLENNY, A. M.; WORTHINGTON, H. V. Systematic review of population-based epidemiological studies of orofacial pain. **J. Dent.**, Bristol, Eng , v. 29, n. 7, p. 451-467, 2001.

MACFARLANE, T.V. et al. Orofacial pain in the community: Prevalence and associated impact. **Community Dent. Oral Epidemiol.**, Copenhagen, v. 30, n.1, p. 52-60, 2002.

MCKEMY, D. D.; NEUHAUSSER, W. M.; JULIUS, D. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. **Nature**, London, v. 416, n. 6876, p. 52-58, 2002.

MCNEILL, C. **Temporomandibular disorders**: guidelines for classification, assessment and management. Quintessence: Chicago, 1990.

MCNEILL, C. Management of temporomandibular disorders: concepts and controversies. **J. Prosthet. Dent.**, St. Louis Mo, v. 77, n. 5, p. 510-522, 1997.

MACPHERSON, L. J. et al. The pungency of garlic: activation of TRPA1 and TRPV1 in response to allicin. **Curr. Biol.**, London, UK, v.15, n.10, p. 929-34, 2005.

MAIXNER, W. et al. Sensitivity of patients with painful temporomandibular disorders to experimentally evoked pain: evidence for altered temporal. **Pain**, Amsterdam, v. 76, n. 1/2, p. 71-81, 1998.

MANFREDINI, D.; LOBBEZOO, F. Relationship between bruxism and temporomandibular disorders: a systematic review of literature from 1998 to 2008. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, MO, v. 109, n. 6, p. 26-50, 2010.

MASON, L. et al. Systematic review of topical capsaicin for the treatment of chronic pain. **BMJ**, London, v. 328, n. 7446, p. 991, 2004.

MCCMAHON, S. B.; KOLTZENBURG, M. Novel classes of nociceptors: beyond Sherrington. **Trends Neurosci.**, Amsterdam, v. 13, n. 6, p. 199-201, 1990.

MEDEIROS, M. H. et al. Horseradish peroxidase-catalyzed conjugation of eugenol with basic amino acids. **Free Radic. Res.**, Yverdon, Switzerland, v. 25, n.1, p. 5-12, 1996.

MEDVEDEVA, Y. V.; KIM, M. S.; USACHEV, Y. M. Mechanisms of prolonged presynaptic Ca²⁺ signaling and glutamate release induced by TRPV1 activation in rat sensory neurons. **J. Neurosci.**, Baltimore, Md, v. 28, n. 20, p. 5295-5311, 2008.

MENSE, S. Nociception from skeletal muscle in relation to clinical muscle pain. **Pain**, Amsterdam, v. 54, n. 3, p. 241-89, 1993.

MEOTTI, F. C.; COELHO, I. S.; SANTOS, A. R. S. The nociception induced by glutamate in mice is potentiated by protons released into the solution. **J. Pain**, Philadelphia, PA, v. 11, n. 6, p. 570-578, 2010.

MERSKEY, H.; BOGDUK, N. Classification of chronic pain. In: MERSKEY, H.; BOGDUK, N. (Ed.). **Part III: Pain terms, a current list with definitions and notes on usage. IASP task force on taxonomy.** Seattle: IASP Press, 1994. p. 209-214.

MESSLINGER, K. What is a nociceptor? **Anaesthesist**, Berlin, v. 46, n. 2, p. 142-153, 1997.

MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Prog. Neurobiol.**, Oxford, v. 57, n. 1, p. 1-164, 1999.

MILLER, K. E. et al. Organization of glutamate like-immunoreactivity in the rat superficial dorsal horn: light and electron microscopic observations. **Synapse**, New York, v. 2, n. 1, p. 28-36, 1988.

- MOGIL, J. S. et al. Transgenic expression of a dominant-negative ASIC3 subunit leads to increased sensitivity to mechanical and inflammatory stimuli. **J. Neurosci.**, Baltimore, Md, v. 25, n. 43, p. 9893-901, 2005
- MOLIN, C. Vertical isometric muscle forces of the mandible. A comparative study of subjects with and without manifest mandibular pain dysfunction syndrome. **Acta Odontol. Scand.**, Stockholm , v. 30, n. 4, p. 485-99, 1972.
- MONTELL, C.; RUBIN, G. M. Molecular characterization of the *Drosophila* *trp* locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. **Neuron**, Cambridge, Mass , v. 2, n. 4, p.1313-1323, 1989.
- MORIYAMA, T. et al. Possible involvement of P2Y2 metabotropic receptors in ATP-induced transient receptor potential vanilloid receptor 1-mediated thermal hypersensitivity. **J. Neurosci.**, Baltimore, Md, v. 23, n. 14, p. 6058-6062, 2003.
- NAGATA, K. et al. Nociceptor and hair cell transducer properties of TRPA1, a channel for pain and hearing. **J. Neurosci.**, Baltimore, Md , v. 25, n. 16, p. 4052-4061, 2005.
- NAMBA, S.; NISHIMOTO, A. Stimulation of internal capsule thalamic sensory nucleus (VPM) and cerebral cortex inhibition deafferentation hyperactivity provoked after Gasserian Ganglionectomy in cat. **Acta Neurochir.**,Wien, v. 42, p. 243-247, 1988.
- NEALEN, M. L. et al. TRPM8 mRNA is expressed in a subset of cold-responsive trigeminal neurons from rat. **J. Neurophysiol.**, Washington, v. 90, n. 1, p. 515-20, 2003.
- OHKUBO, T.; SHIBATA, M. The selective capsaicin antagonist capsazepine abolishes the antinociceptive action of eugenol and guaiacol. **J. Dent. Res.**, Chicago, v. 76, p. 848-51, 1997.

OHRBACH, R.; DWORKIN, S. F. Longitudinal changes in TMD: Relationship of changes in pain to changes in clinical and psychological variables. **Pain**, Amsterdam, v. 74, n. 2/3, p. 315-326, Feb. 1998.

OKAZAWA, M. et al. Noxious heat receptors present in cold-sensory cells in rats. **Neurosci. Lett.**, Amsterdam, v. 359, n.1/2, p. 33-6, 2004.

OLSZEWSKI, J. On the anatomical and functional organization of the spinal trigeminal nucleus. **J. Comp. Neurol.**, Philadelphia, v. 92, n. 3, p. 401-413, 1950.

PACÁK, K.; PALKOVITS, M. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. **Endocr. Rev.**, Baltimore, v. 22, n. 4, p. 502-48, 2001.

PARK, C. K. et al. Eugenol inhibits sodium currents in dental afferent neurons. **J. Dent. Res.**, Chicago, v. 85, n. 10, p. 900-904, 2006.

PARK, S. H.; SIM, Y. B.; LEE, J. K. The analgesic effects and mechanisms of orally administered eugenol. **Arch. Pharm. Res.**, Seoul, v. 34, n. 3, p. 501-507, 2011.

PARPURA, V. et al. Neuroligand evoked calcium-dependent release of excitatory amino acids from Schwann Cells. **J. Neurosci.**, Baltimore, Md, v. 15, n. 8, p. 5831-5839, 1995.

PATAPOUTIAN, A. TRP channels and thermosensation. **Chem. Senses**, London, v. 30, n. Suppl. 1, 193-4, 2005.

PATAPOUTIAN, A.; TATE, S.; WOOLF, C. J. Transient receptor potential channels: targeting pain at the source. **Nat. Rev. Drug Discov.**, London, v. 8, n. 1, p. 55-68, 2009.

PEIER, A. M. et al. A TRP channel that senses cold stimuli and

menthol. **Cell**, Cambridge, v. 108, n. 5, p. 705-15, 2002.

PELKEY, K. A.; MARSHALL, K. C. Actions of excitatory amino acids on mesencephalic trigeminal neurons. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, Ottawa, v. 76, n. 9, p. 900-8, 1998.

PEREIRA, E. M. **Avaliação do papel de receptores NMDA para glutamato na nocicepção orofacial aguda e crônica em ratos.** Dissertação (Mestrado em Farmacologia)- UFPR, Curitiba, 2006.

PETRALIA, R. S.; YOKOTANI, N.; WENTHOLD, R. J. Light and electron microscope distribution of the NMDA receptor subunit NMDAR1 in the rat nervous system using a selective antipeptide antibody. **J. Neurosci.**, Baltimore, Md, v. 14, n. 2, p. 667-696, 1994.

PETRUCCI, A. et al. Effectiveness of low-level laser therapy in temporomandibular disorders: a systematic review and meta-analysis. **J. Orofac. Pain**, Carol Stream, Ill, v. 25, n. 4, p. 298-307, 2011.

PETRUS, M. et al. A role of TRPA1 in mechanical hyperalgesia is revealed by pharmacological inhibition. **Mol. Pain**, London, n. 3, p. 40, 2007.

PIANI, D. et al. Murine brain macrophages induce NMDA receptor mediated neurotoxicity in vitro by secreting glutamate. **Neurosc. Lett.**, Amsterdam, v. 133, n. 2, p. 159-162, 1991.

PRAKASH, P.; GUPTA, N. Therapeutic uses of *Ocimum sanctum* Linn (Tulsi) with a note on eugenol and its pharmacological actions: a short review. **Indian J. Physiol. Pharmacol.**, New Delhi, v. 49, n. 2, p. 125-131, 2005.

PRAMOD, K.; ANSARI, S. H.; ALI, J. Eugenol: a natural compound with versatile pharmacological actions. **Nat Prod. Commun.** Westerville, OH, v. 5, n. 12, p. 1999-2006, 2010.

PREMKUMAR, L. S.; AHERN, G. P. Induction of vanilloid receptor channel activity by protein kinase C. **Nature**, London, v. 408, n. 6815, p. 985-990, 2000.

PRICE, M.P. et al. The DRASIC cation channel contributes to the detection of cutaneous touch and acid stimuli in mice. **Neuron**, Cambridge, Mass, v. 32, n. 6, p. 1071-1083, 2001.

RAO, A.; ABBOTT, J. Using botulinum toxin for pelvic indications in women. **Aust. N. Z. J. Obstet. Gynaecol.**, Melbourne, v. 49, n. 4, p. 352-7, 2009.

REID, G.; FLONTA, M. L. Ion channels activated by cold and menthol in cultured rat dorsal root ganglion neurones. **Neurosci. Lett.**, Amsterdam, v. 324, n. 2, p. 164-8, 2002.

RIBAS, C. M. et al. Antinociceptive effect of the Polygala sabulosa hydroalcoholic extract in mice: evidence for the involvement of glutamatergic receptors and cytokine pathways. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.**, Copenhagen, Denmark, v. 103, n. 1, p. 43-47, 2008.

RIBEIRO R. A. et al. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, Amsterdam, v. 387, n. 1, p.111-118, 2000.

RIVEROS, N.; ORREGO, F. N-methylaspartate-activated calcium channels in rat brain cortex slices. Effect of calcium channel blockers and of inhibitory and depressant substances. **Neuroscience**, Oxford, v. 17, n. 3, p. 541-6, 1986.

RO, J. Y.; SVENSSON, P.; CAPRA, N. Effects of experimental muscle pain on electromyographic activity of masticatory muscles in the rat. **Muscle Nerve**, New York, v. 25, n. 4, p. 576-84, 2002.

RO, J.Y., CAPRA, N. F. Assessing mechanical sensitivity of masseter muscle in lightly anesthetized rats: a model for craniofacial muscle hyperalgesia. **Neurosci Res.**, New York, v. 56, n. 1, p. 119–123, 2006.

RO, J.Y. et al. Role of soluble guanylate cyclase in the trigeminal subnucleus caudalis in capsaicin-induced muscle hypersensitivity. **Brain Res.**, Amsterdam, v. 1184, p.141–148, 2007.

RO, J.Y.; LEE, J. S.; ZHANG, Y. Activation of TRPV1 and TRPA1 leads to muscle nociception and mechanical hyperalgesia. **Pain**, Amsterdam, v. 144, v. 3, p. 270-277, 2009.

ROCHA-GONZÁLEZ, H. I. et al. Acid increases inflammatory pain in rats: effect of local peripheral ASICs inhibitors. **Eur. J. Pharmacol.**, Amsterdam, v. 603, n.1/3, p. 56-61, 2009.

ROSSI, H. L. et al. Characterization of cold sensitivity and thermal preference using an operant orofacial assay. **Mol. Pain**. London, v. 2, p. 37, 2006.

SACERDOTE, P.; LEVRINI, L. Peripheral mechanisms of dental pain: the role of substance P. **Mediators Inflamm.**, Oxford, 2012:951920, 2012.

SAHARA, Y. et al. Glutamate receptor subunits GluR5 and KA-2 are coexpressed in rat trigeminal ganglion neurons. **J. Neuroscience**, Baltimore, Md, v. 17, n. 17, p. 6611-25, 1997.

SALTER, M. W. Cellular signalling pathways of spinal pain neuroplasticity as targets for analgesic development. **Curr. Top. Med. Chem.**, Hilversum, The Netherlands, v. 5, n. 6, p. 557-567, 2005.

SANTOS, A. R.; CALIXTO, J. B. Ruthenium red and capsazepine antinociceptive effect in formalin and capsaicin models of pain in mice. **Neurosci. Lett.**, Amsterdam, v. 235, n.1/2, p. 73-76, 1997.

SANTOS, A. R. S.; GADOTTI, V. M.; OLIVEIRA, G. L. Mechanisms involved in the antinociception caused by agmatine in mice. **Neuropharmacology**, Oxford, v. 48, n. 7, p. 1021–1034, 2005.

SARLANI, E.; GREENSPAN, J. D. Evidence for generalized hyperalgesia in temporomandibular disorders patients. **Pain**, Amsterdam, v. 102, n. 3, p. 221-226, 2003.

SAWADA, Y. et al. Activation of transient receptor potential ankyrin 1 by hydrogen peroxide. **Eur. J. Neurosci.**, Oxford, v. 27, n. 5, p.1131-42, 2008.

SCHEIDT, C. et al. Evidence for the involvement of glutamatergic receptors in the antinociception caused in mice by the sesquiterpene drimanial. **Neuropharmacology**, Oxford, v. 43, n. 3, p. 340–347, 2002.

SEYBOLD, V. S. The role of peptides in central sensitization. **Handb Exp. Pharmacol.**, Berlin, v. 194, p. 451-91, 2009.

SESSLE, B. J. The neural basis of temporomandibular joint and masticatory muscle pain. **J. Orofac. Pain**, Carol Stream, Ill, v. 13, n. 4, p. 238-45, 1999.

SHEN, Y. F. et al. Randomized clinical trial of acupuncture for myofascial pain of the jaw muscles. **J. Orofac. Pain**, Carol Stream, Ill , v. 23, n. 4, p. 353-9, 2009.

SHIMADA, S. G.; LAMOTTE, R. H. Behavioral differentiation between itch and pain in mouse. **Pain**, Amsterdam, v. 139, n. 3, p. 681-7, 2008.

SHIN, J. et al. Bradykinin-12-lipoxygenase-VR1 signaling pathway for inflammatory hyperalgesia. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, Washington, v. 99, p. 10150-10155, 2002.

SHINKAI, K. et al. Effect of the concentrations of calcium chloride and synthetic peptides in primers on dentin bond strength of an experimental adhesive system. **Dent. Mater J.**, Tokyo, v. 29, n. 6, p. 738-46, 2010.

SIEMENS, J. et al. Spider toxins activate the capsaicin receptor to produce inflammatory pain. **Nature**, London, v. 444, n. 7116, p. 208-12, 2006.

SIMONS, D. G. Muscular pain syndromes. **Adv. Pain Res. Ther.**, New York, v. 17, p. 1-41, 1990.

SLADE, G. D. et al. Influence of psychological factors on risk of temporomandibular disorders. **J. Dent. Res.**, Chicago, v. 86, n. 11, p. 1120-1125, 2007.

SLUKA, K. A.; WILLIS, W. D. Increased spinal release of excitatory aminoacids following intradermal injection of capsaicin is reduced by a protein kinase G inhibitor. **Brain Res.**, Amsterdam, v. 798, n. 1, p. 281-286, 1998.

SOHN, M. K. et al. Inhibition of motor unit firing during experimental muscle pain in humans. **Muscle Nerve**, New York, v. 23, n. 8, p. 1219-1226, 2000.

STEEN, K. H.; REEH, P. W. Sustained graded pain and hyperalgesia from harmless experimental tissue acidosis in human skin. **Neurosci. Lett.**, Amsterdam, v. 154, n. 1/2, p.113-116, 1993.

STOHLER, C. S. Clinical perspectives on masticatory and related muscle disorders. In: SESSLE, B. J.; BRYANT, P. S.; DIONNE, R. A. (Ed.). **Temporomandibular disorders and related pain conditions**. IASP Press, 1995. p. 3-29. (Progress in Pain Research and Manegement, vol. 4.)

STOHLER, C. S. Muscle-related temporomandibular disorders. **J. Orofac. Pain**, Carol Stream, Ill, v. 13, p. 273-284, 1999.

STORY, G. M. et al. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. **Cell**, Cambridge, Ma, v. 112, n. 6, p. 819-29, 2003.

STRASSMAN, A. M.; RAYMOND, S. A.; BURSTEIN, R. Sensitization of meningeal sensory neurons and the origin of headaches. **Nature**, London, v. 384, n. 6609, p. 560-564, 1996.

SVENSSON, P. et al. Glutamate-evoked pain and mechanical allodynia in the human masseter muscle. **Pain**, Amsterdam, v. 101, p. 221-227, 2003.

SVENSSON, P. et al. Pain effects of glutamate injections into human jaw or neck muscles. **J. Orofac. Pain**, Amsterdam, v. 19, p. 109-118, 2005.

TAKEDA, M. et al. Role of capsaicin-sensitive primary afferent inputs from the masseter muscle in the C1 spinal neurons responding to tooth-pulp stimulation in rats. **Exp. Brain Res.**, Berlin, v. 160, n. 1, p. 107-17, 2005.

TALLAKSEN-GREENE, S. J. et al. Excitatory amino acid binding sites in the trigeminal principal sensory and spinal trigeminal nuclei of the rat. **Neurosci. Lett.**, Amsterdam, v. 141, n.1, p. 79-83, 1992.

TALLENTS, R. H. Etiologic theory and prevention of temporomandibular joint disorders: Reaction paper. **Adv. Dent. Res.**, Washington, v. 5, p. 67-68, 1991.

TALLENTS, R. H.; STEIN, S. I.; MOSS, M. E. The role of occlusion in temporomandibular disorders. In: FONSECA, R. J. (Ed.). **Oral and Maxillofacial Surgery: temporomandibular disorders**, v. 4. Philadelphia, PA: W.B. Saunders, 2000. p. 194-237.

TANG, M. L.; HAAS, D. A.; HU, J. W. Capsaicin-induced joint inflammation is not blocked by local anesthesia. **Anesth. Prog.**, Chicago, v. 51, n. 1, p. 2-9, 2004.

TEIXEIRA, M. J. **A lesão do trato de Lissauer e do corno posterior da substância cinzenta da medula espinal e a estimulação elétrica do sistema nervoso central para o tratamento da dor por desafferentação.** 256f. Tese (Doutorado)-Faculdade de Medicina, USP, 1990.

TJØLSEN, A. et al. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, Amsterdam, v. 51, p. 5-17, 1992.

TOGNETTO, M. et al. Anandamide excites central terminals of dorsal root ganglion neurons via vanilloid receptor-1 activation. **J. Neurosci.**, Baltimore, Md, v. 21, n. 4, p. 1104-1109, 2001.

TOMINAGA, M. et al. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-modulating stimuli. **Neuron**, Cambridge, Mass, v. 21, n. 3, p. 531-543, 1998.

TREVISANI, M. et al. 4-Hydroxynonenal, an endogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, Washington, v. 104, n. 33, p. 13519-13524, 2007.

TRUSSEL, L.O. et al. Rapid desensitization of glutamate receptors in vertebrate central neurons. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, Washington, v. 85, n.12, p. 4562-4566, 1988.

TSAVALER, L. et al. Trp-p8, a novel prostate-specific gene, is up-regulated in prostate cancer and other malignancies and shares high homology with transient receptor potential calcium channel proteins. **Cancer Res.**, Baltimore, Md, v. 61, n. 9, p. 3760-3769, 2001.

TSUZUKI, K. et al. Menthol-induced Ca²⁺ release from presynaptic Ca²⁺ stores potentiates sensory synaptic transmission. **J. Neurosci.**, Baltimore, Md, v. 24, n. 3, p.762-771, 2004.

TURP, J. C. et al. In patients with temporomandibular disorders, do particular interventions influence oral health-related quality of life? A

qualitative systematic review of the literature. **Clin. Oral Implants Res.**, Copenhagen , v. 18, n. Suppl. 3, p.127-137, 2007.

USUNOFF, K. G.; MARANI, E.; SCHOEN, J. H. R. The trigeminal system in man. **Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.**, Berlin, v. 136, p. 1-118, 1997.

VAN DER STELT, M.; DI MARZO, V. Endovanilloids. Putative endogenous ligands of transient receptor potential vanilloid 1 channels. **Eur. J. Biochem.**, Berlin, v. 271, n. 10, p. 1827-1834, 2004.

VENANCIO, R. A.; ALENCAR, F.G. JR.; ZAMPERINI, C. Botulinum toxin, lidocaine, and dry-needling injections in patients with myofascial pain and headaches. **Cranio**, Chattanooga, Tenn, v. 27, n. 1, p. 46-53, 2009.

VOILLEY, N. et al. Nonsteroid anti-inflammatory drugs inhibit both the activity and the inflammation-induced expression of acid-sensing ion channels in nociceptors. **J. Neurosci.**, Baltimore, Md, v. 21, n. 20, p. 8026-33, 2001.

WAITE, P. M. E.; ASHWELL, K. W. S. Trigeminal sensory system. In: PAXINOS, G.; MAI, J. K. **The Human nervous system**. 2. ed. New York: Elsevier, 2004.

WALDMANN, R.; LAZDUNSKI, M. H(+)-gated cation channels: neuronal acid sensors in the NaC/DEG family of ion channels. **Curr. Opin. Neurobiol.**, London, v. 8, n. 3, p. 418–424, 1998.

WALDMANN, R. et al. H(+)-gated cation channels. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, New York, v. 868, p. 67-76, 1999.

WALL P.D.; MELZACK R. **Textbook of pain**. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1999.

WANAKA, A. Glutamate-like immunoreactive structures in primary

sensory neurons in the rat detected by a specific antiserum against glutamate. **Exp. Brain Res.**, Berlin, v. 65, n. 3, p. 691-694, 1987.

WANG, K.; ARENDT-NIELSEN, L.; SVENSSON, P. Capsaicin-induced muscle pain alters the excitability of the human jaw-stretch reflex. **J. Dent. Res.**, Chicago, v. 81, p. 650-654, 2002.

WANG, Y.Y. et al. The nociceptor ion channel TRPA1 is potentiated and inactivated by permeating calcium ions. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, MD, v. 283, n. 47, p. 32691-703, 2008.

WASNER, G. et al. Topical menthol a human model for cold pain by activation and sensitization of C nociceptors. **Brain**, London, v. 127, n. pt 5, p. 1159-71, 2004.

WEMMIE, J. A.; PRICE, M. P.; WELSH, M. J. Acid-sensing ion channels: advances, questions and therapeutic opportunities. **Trends Neurosci.**, Amsterdam, v. 29, n. 10, p. 578-586, 2006.

WESTLUND, K. N.; MCNEILL, D. L.; COGGESHALL, R. E. Glutamate immunoreactivity in rat dorsal root axons. **Neurosci. Lett.**, Amsterdam, v. 96, n. 1, p. 13-17, 1989.

WIE, M. B. et al. Eugenol protects neuronal cells from excitotoxic and oxidative injury in primary cortical cultures. **Neurosci. Lett.**, Amsterdam, v. 225, n. 2, p. 93-96, 1997.

WU, L. J. et al. Characterization of acid-sensing ion channels in dorsal horn neurons of rat spinal cord. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, MD, v. 279, n. 42, p. 43716-43724, 2004.

XIE, J. et al. ASIC3 and ASIC1 mediate FMRFamide-related peptide enhancement of H⁺-gated currents in cultured dorsal root ganglion neurons. **J. Neurophysiol.**, Washington, v. 89, n. 5, p. 2459-2465, 2003.

YANG, B. H. et al. Activation of vanilloid receptor 1 (VR1) by eugenol. **J. Dent. Res.**, Chicago, v. 82, n. 10, p. 781-785, 2003.

YANO, S. et al. Antinociceptive effect of methyleugenol on formalin-induced hyperalgesia in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, Amsterdam, v. 553, n.1/3,p. 99-103, 2006.

YOGESHWARI, P. et al. Current approaches with the glutamatergic system as targets in the treatment of neuropathic pain. **Expert Opin. Ther. Targets.**, London, v. 13, n. 8, p. 925-943, 2009.

YU, X. M. et al. Involvement of NMDA receptor mechanisms in jaw electromyographic activity and plasma extravasation induced by inflammatory irritant application to temporomandibular joint region of rats. **Pain**, Amsterdam, v. 68, n.1, p. 169–178, 1996.

ZANOTTO, K. et al. Neurons in superficial trigeminal subnucleus caudalis responsive to oral cooling, menthol and other irritant stimuli. **J. Neurophysiol.**, Washington, v. 97, n. 2, p. 966-978, 2007.

ZHOU, S.; BONASERA, L.; CARLTON, S. M. Peripheral administration of NMDA, AMPA or KA results in pain behaviors in rats. **Neuroreport**, Oxford, v. 7, n. 4, p. 895-900, 1996.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*, Amsterdam, v. 16, n. 2, p.109-110, 1983.

ZYGMUNT, P. M. et al. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. **Nature**, London, v. 400, n. 6743, p. 452-7, 1999.