

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

NIVEL: DOUTORADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ENDODONTIA

HELENA FETTER FILIPPINI

**ALTERAÇÕES CENTRAIS E PERIFÉRICAS EM DIFERENTES MODELOS DE DOR PULPAR EM
RATOS**

Porto Alegre

2017

HELENA FETTER FILIPPINI

**ALTERAÇÕES CENTRAIS E PERIFÉRICAS EM DIFERENTES MODELOS DE DOR PULPAR EM
RATOS**

Linha de pesquisa: Etiopatogênese e tratamento das doenças periodontais e periapicais

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul como requisito para obtenção do título de Doutor em Odontologia, na área de concentração de Endodontia

Orientadora: Prof^a. Dra. Maria Martha Campos
Orientador no Doutorado Sanduíche: Barry J Sessle

Porto Alegre

2017

Ficha Catalográfica

F483a Filippini, Helena Fetter

Alteração centrais e periféricas em diferentes modelos de dor pulpar em ratos / Helena Fetter Filippini . – 2017.

107 f.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Maria Martha Campos.

1. Inflamação da polpa dentária. 2. CFA. 3. Óleo de mostarda. 4. Receptores Toll-like 4. 5. Eletromiografia. I. Campos, Maria Martha. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

HELENA FETTER FILIPPINI

**ALTERAÇÕES CENTRAIS E PERIFÉRICAS EM DIFERENTES MODELOS DE DOR PULPAR EM
RATOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul como requisito para obtenção do título de Doutor em Odontologia, na área de concentração de Endodontia

Aprovada em: ____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Maria Martha Campos (Presidente)

Prof^a. Dr^a. Juliana Geremias Chichorro

Prof^a. Dr^a. Patrícia Maria Poli Kopper Mora

Prof. Dr. José Antônio Poli de Figueiredo

Prof. Dr. Maximiliano Schunke Gomes

Prof. Dr. João Batista Blessmann Weber (Suplente)

Dedicatória

Dedico esse trabalho aos meus grandes amores, Rogério, Victor, Pedro e Nelson.

O amor de vocês foi inspirador.

Aos meus pais Hugo (in memoriam) e Irmgard.

A todos aqueles que sofrem de dor, é por vocês que busco respostas.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Maria Martha Campos pelas grandes lições científicas e de vida que me deu. Tua paixão e dedicação à ciência são admiráveis. Te tenho como exemplo e levarei muito de ti no meu coração.

Ao Prof. Dr. Barry Sessle por me aceitar em seu laboratório na Universidade de Toronto e me permitir a realização de um sonho que iniciou na graduação. Teu conhecimento compartilhado foi a joia rara que o doutorado sanduíche me presenteou.

Ao Prof. Dr. José Antônio Poli de Figueiredo que me inspirou na escolha da Endodontia, gostaria de agradecer pelas inúmeras vezes que me tiraste da zona de conforto. E também, por colocar no meu caminho pessoas que fizeram toda a diferença na minha vida profissional Prof^a Dr^a. Lili Luske Bammann e Prof^a. Dr^a Maria Martha Campos.

Ao Prof. Dr. Eleutério Martins (*in memoriam*) que me apresentou o mundo mágico do estudo da dor orofacial. O primeiro artigo que li do prof. Sessle veio de tuas mãos. Alí, daquele dia, eu decidi que estudaria dor por toda vida. Obrigada pela tua importante contribuição na minha formação.

Aos professores Dr. Maximiliano Schunke Gomes, Dr^a. Patrícia Maria Poli Kopper Mora, Dr^a. Juliana Geremias Chichorro por aceitarem o convite de participar de minha banca de doutorado e serem exemplos de dedicação e comprometimento à ciência.

À Prof^a. Dr^a. Limor Avivi-Arber pelo aprendizado e disponibilidade durante os registros de eletromiografia.

À Prof^a. Dr^a. Siew-Ging Gong por abrir as portas do seu laboratório, na Universidade de Toronto, para a execução do Western Blotting.

Ao Prof. Dr. Pavel Cherkas pela ajuda na construção do modelo experimental.

À aluna de pós-doutorado da Universidade de Toronto, Graziella Molska, pela amizade, parceria de trabalho e discussões científicas nesse um ano de convivência em Toronto.

À Yamini Arudchelvan pelo auxílio nas análises de Western Blotting.

Aos demais colegas da Universidade de Toronto, Tetsuro Watase, Jacqueline Gross, Luana Melo e David Tang pelo acolhimento, amizade e auxílio na execução dos protocolos de eletromiografia.

À Maryam Zanjir pela ajuda na tabulação de dados.

Aos colegas da Endodontia do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da PUCRS, Cauana Tavares, Rafael Hartmann, Thayana Sousa e Cynthia Pintos pela amizade e carinho.

À secretária do Instituto de Toxicologia e Farmacologia (INTOX) da PUCRS, Priscila Salles pela competência, disponibilidade e atenção durante todo o curso de doutorado.

À Prof^a Dr^a. Fernanda Morrone pelos ensinamentos científicos durante os seminários realizados.

Aos colegas e amigos do INTOX: Maria Eduarda Azambuja, Pedro Chagastelles, Valnês Rodrigues Júnior, Natália Nicoletti, Natália Cignachi, Ana Paula Danigno, Priscila Pail, Rodrigo Braccini, Tânia Mielcke, Lênio Togni, Gustavo Dalto, Thais Erig, Fernanda Cruz, Carlos Eduardo Leite e Juliano Soares pelo apoio, amizade e atenção.

Aos amigos e parceiros de pesquisa Kesiane Costa, Raquel Dal Sasso Freitas e Paulo Scalzilli pela preciosa ajuda, dedicação e comprometimento durante a execução desse trabalho. O apoio de vocês foi fundamental para a realização dessa pesquisa.

À Janaína Silva e Luciana Ferreira pela dedicação nos processamentos de imunoistoquímica.

À Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, representada pelo seu Diretor, Prof. Alexandre Bahlis, pela qualidade de ensino proporcionada.

À Coodenação do Curso de Pós-Graduação em Odontologia da PUCRS em nome da Prof^a Dr^a. Ana Maria Spohr, pela excelência do curso de doutorado.

À CAPES, pelo apoio financeiro que possibilitou a realização deste doutorado e pela concessão da bolsa de doutorado sanduíche pelo apoio financeiro durante todo esse curso de Doutorado.

Ao CNPq e Finep pelo apoio financeiro.

Aos meus amores Rogério da Silveira Schöler, Pedro Bofill Schöler, Nelson Bofill Schöler e Victor Filippini Schöler pelo apoio, amor e compreensão.

Aos meus pais Hugo Reinaldo Filippini e Irmgard Fetter Filippini pelo incentivo, confiança e amor.

LISTA DE FIGURAS

Figura suplementar 1: Examples of EMG traces following LPS (A) or MO (B) application into the right maxillary first molar pulp.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACC: Córtex cingulado anterior

ATP: Trifosfato de Adenosina

CD-14: *Cluster of differentiation 14*

CFA: Adjuvante completo de Freund

CGRP: Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

EMG: Eletromiografia

ERK: *Extracellular signal-activated kinase*

GDNF: Fator neurotrófico derivado da glia

Hsp70: *Heat-shock protein 70*

IASP: Associação Internacional para o Estudo da Dor

LPS: Lipopolissacarídeo

LPS-RS: Lipopolissacarídeo de *Rhodobacter sphaeroides*

LTM: Mecanorreceptores de baixo limiar

MAPK: *Mitogen-activated protein kinase*

MyD88: Fator de diferenciação mieloide 88

NADPH: *Hydroxymethylglutaryl CoA reductase*

Nav1.7: canais de sódio voltagem-dependentes subtipo Nav1.7

NF- κ B: Fator de transcrição fator nuclear κ B

NGF: Fator de crescimento do nervo

NKA: Neurocinina A

NMDA: N-metil D-Aspartato

NS: Nociceptores específicos

P2X3: Receptores purinérgicos P2X3

P2X7: Receptores purinérgicos P2X7

PA: Potenciais de ação

ROS: Espécies reativas de oxigênio

SNC: Sistema nervoso central

SNP: Sistema nervoso periférico

TLR: Receptores Toll-like

TLR1: Receptor Toll-like subtipo 1

TLR11: Receptor Toll-like subtipo 11

TLR4: Receptor Toll-like subtipo 4

TRP: Receptores de potencial transitório

TRPA: Receptores de potencial transitório anquirina

TRPA1: Receptor de potencial transitório anquirina 1

TRPC: Receptor de potencial transitório canônico

TRPM: Receptor de potencial transitório melastatina

TRPM8: Receptor de potencial transitório melastatina 8

TRPML: Receptor de potencial transitório mucolipina

TRPP: Receptor de potencial transitório policistina

TRPV: Receptores de potencial transitório vaniloide

TRPV1: Receptor de potencial transitório vaniloide 1

TRPV2: Receptor de potencial transitório vaniloide 2

WDR: Neurônio de ampla faixa dinâmica

SUMÁRIO

1 RESUMO	13
2 ABSTRACT.....	15
3 INTRODUÇÃO	17
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	35
5 REFERÊNCIAS.....	41
<i>ANEXO A- Carta de aprovação pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia/PUCRS.....</i>	<i>49</i>
<i>ANEXO B- Carta de aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais/PUCRS</i>	<i>50</i>
<i>ANEXO C- Comprovante de submissão do manuscrito ao Periódico Physiology and Behavior.....</i>	<i>51</i>

1 RESUMO

Os mecanismos centrais e periféricos envolvidos na dor pulpar ainda não estão totalmente claros. O presente estudo comparou, inicialmente, o modelo de inflamação pulpar crônica induzido pela aplicação de adjuvante completo de Freund (CFA), em polpas de ratos, com outros modelos de pulpíte. Para tanto, as polpas dos primeiros molares superiores esquerdos de ratos Wistar foram acessadas. Foram criados 4 grupos experimentais conforme a abordagem pulpar: aberto, fechado, CFA e naïve. As alterações comportamentais, bem como, o ganho de peso corporal e o consumo de água e ração, foram avaliados em diferentes tempos experimentais (1, 2, 3 e 8 dias). Após a eutanásia, amostras de sangue, cérebro e gânglio trigeminal (GT) foram coletadas para análises posteriores. Todos os grupos experimentais com exposição da polpa apresentaram diminuição do ganho de peso corporal (até o 3^o dia). A redução do consumo de ração foi observada em todos os grupos no primeiro dia. O grupo CFA mostrou redução significativa na atividade locomotora (em 1 e 3 dias), que foi associada ao aumento da ativação das células satélites da glia no GT ipsilateral. A ativação de astrócitos na amígdala não foi afetada nos grupos estudados. A segunda parte deste estudo investigou a participação do receptor Toll-like 4 (TLR4), na mediação da pulpíte aguda causada pela aplicação de óleo de mostarda (OM), um agonista de receptores de potencial transitório anquirina-1 (TRPA1), em polpas de ratos. Estudos preliminares foram realizados comparando a atividade sensoriomotora dos músculos mastigatórios diante da aplicação de lipopolissacarídeo (LPS) ou OM na polpa dentária. O modelo utilizando OM na polpa de ratos foi escolhido, devido ao aumento marcante das atividades eletromiográficas (EMG), quando comparado ao LPS. Os animais foram pré-tratados por via intratecal (i.t.) com o antagonista seletivo dos receptores TLR4, o LPS-RS (25 µg/10 µl,

10 min antes da aplicação pulpar de OM. O grupo controle recebeu solução salina (10 µl) (grupo veículo), pela mesma via, no mesmo tempo de administração. Para tal, foi realizada uma cirurgia esterotáxica para permitir o acesso ao subnúcleo caudal trigeminal. As alterações das atividades de EMG dos músculos mastigatórios foram registradas durante 15 min após a aplicação de OM na polpa. O subnúcleo caudal trigeminal foi removido após a eutanásia, para avaliação da expressão de TLR4, através da análise de western-blotting. As alterações da atividade de EMG nos músculos digástricos anteriores foram significativamente reduzidas pela administração intratecal de LPS-RS no subnúcleo caudal do trigêmeo ($p < 0,05$), indicando um papel relevante para esses receptores nos mecanismos de sensibilização central, após a aplicação de OM. O conjunto de dados obtidos sugerem a participação das células satélites da glia no modelo de pulpíte crônica induzida por CFA, bem como, dos receptores TLR4 no modelo de pulpíte aguda provocada pela aplicação de OM em polpas de ratos. Essas evidências contribuem para o melhor entendimento dos mecanismos relacionados com a transmissão da dor pulpar aguda e crônica.

Palavras – Chave: Inflamação da polpa dentária, CFA, Óleo de mostarda, Gânglio trigeminal, Células satélites da glia, Amígdala, Receptores Toll-like 4, LPS-RS, Eletromiografia.

2 ABSTRACT

The central and peripheral mechanisms involved in pulpal pain are still unclear. This study compared, initially, the chronic pulpitis model evoked by the application of complete Freund's adjuvant (CFA) into the pulps of rats, with other models of pulpitis. For this purpose, the pulps of the left upper first molars of Wistar rats were accessed. There were four experimental groups according to the surgical procedure: open, closed, CFA and naïve. Behavioral changes, as well as, body weight gain and food and water consumption, were evaluated at different experimental times (1, 2, 3 and 8 days). After euthanasia, blood, brain and trigeminal ganglion (TG) samples were collected for further analysis. All experimental groups with pulp access had a decrease in body weight gain (for up to 3 days). A reduction in food consumption was observed in all the groups with pulp exposure, on the first day. The CFA group showed a significant reduction of locomotor activity (at 1 and 3 days), which was associated with increased satellite glial cells activation in the ipsilateral TG. Activation of astrocytes in the amygdala was not affected in the studied groups. The second part of this study investigated the relevance of Toll-like receptor 4 (TLR4) activation in the acute pulpitis caused by the application of the transient receptor potential ankyrin-1 (TRPA1) mustard oil (MO), into the rat pulps. Preliminary studies were performed to compare the sensorimotor activity of the masticatory muscles with the application of lipopolysaccharide (LPS) or MO in the dental pulp. The model using MO application into the pulp of rats was selected, because of the marked increase of the electromyographic activities evoked by this agent, when compared to LPS. The animals received a intrathecal (i.t.) pre-treatment with the TLR4 LPS-RS antagonist (25 µg / 10 µl) or saline solution (10 µl) (vehicle group), 10 min before pulp application of MO. For this purpose, a stereotaxic surgery was performed to access

the trigeminal subnucleus caudalis. Changes in electromyography activity (EMG) of masticatory muscles were recorded for 15 min after the MO application into the pulp. The trigeminal caudalis subnucleus was removed after euthanasia, for evaluation of TLR4 expression by western blotting analysis. Changes in EMG activity in anterior digastric muscles were significantly reduced by the intrathecal administration of LPS-RS in the trigeminal subnucleus caudalis ($p < 0.05$). The data obtained suggest the participation of satellite glial cells in the chronic pulpitis model induced by CFA, as well as, TLR4 receptors in the acute pulpitis model caused by MO application into the rat pulps. Altogether, the present results shed new light on the mechanisms underlying acute and chronic tooth pulp inflammatory pain.

Key Words: Tooth pulp inflammation, CFA, Mustard oil, Trigeminal ganglion, Satellite glial cells, Amygdala, Toll like 4 receptor, LPS-RS, Electromyography.

3 INTRODUÇÃO

3.1 Considerações Gerais

A dor envolvendo a polpa dentária é uma das mais intensas relatadas pelo ser humano. Por ser um tecido conjuntivo frouxo, circunscrito por dentina, a polpa, diferentemente de outros tecidos, não tem como se expandir diante de uma inflamação, por causa das paredes mineralizadas da dentina. Tal fato contribui para a intensidade do processo nociceptivo envolvendo a polpa. Uma melhor compreensão da repercussão das respostas inflamatórias pulpares, bem como, dos mecanismos relacionados com a dor dentária, representa um grande desafio para o Cirurgião-Dentista, particularmente na área de Endodontia.

O papel dos mediadores químicos da inflamação na manutenção do processo algíco pulpar tem sido bastante investigado. Entretanto, algumas das alterações centrais e periféricas relacionadas com a dor de origem pulpar ainda necessitam de estudos adicionais. Foi demonstrado que a polpa de um pré-molar, por exemplo, contém mais de dois mil neurônios sensitivos. Vários fenômenos neurais ocorrem durante o processo inflamatório pulpar; dentre eles, a neuroplasticidade e a sensibilização central. Muitas vezes, a ocorrência desses fenômenos pode levar a mecanismos de cronicidade da dor (Okeson, 2006; Hargreaves e Cohen, 2011; Sessle 2011; Peirs e Seal, 2016).

A participação do componente emocional na dor crônica é bem descrita; porém, seu papel nas dores inflamatórias agudas ainda não foi totalmente investigado. Estudos mostram que o sistema límbico, uma das principais unidades funcionais do cérebro, relaciona-se à emoção e ao comportamento. Assim sendo, permite a interpretação do indivíduo acerca da situação vivenciada, bem como, o armazenamento dessa experiência

como memória. Mecanismos neurais podem ser induzidos a partir de experiências anteriores, podendo influenciar sua interpretação e percepção no sistema nervoso central (SNC) (Neugebauer et al., 2003; Cao et al., 2009; Jeon et al., 2010; Peirs e Seal 2016).

3.2 Definição de Dor

Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), “a dor se caracteriza como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano real ou potencial dos tecidos ou, descrita em termos de tal dano”. A dor é subjetiva e cada indivíduo aprende a utilizar este termo por meio de suas experiências (Loeser e Treede, 2008).

O termo nocicepção está relacionado ao reconhecimento de sinais dolorosos pelo sistema nervoso, que processam informações relacionadas à lesão. Em 1994, a IASP já afirmava que a atividade induzida nas vias nociceptivas por um estímulo nociceptivo não é dor, é nocicepção. A dor seria algo mais abrangente, podendo ser considerada um estado psicológico. Baseado nestes conceitos, o termo dor seria mais bem aplicado aos seres humanos do que aos animais, pelo fato do envolvimento de componentes cognitivos e emocionais. Mesmo assim, tornou-se uma convenção o uso do termo “dor” para humanos e animais (Hellebrekers, 2002).

A nocicepção é o componente fisiológico da dor e compreende os processos de transdução, transmissão e modulação do estímulo nociceptivo. Após um estímulo nociceptivo, diversas alterações neuroendócrinas acontecem, promovendo um estado de hiperexcitabilidade dos sistemas nervoso central e periférico (Klaumann et al., 2008). A dor tem como principal função proteger o organismo de uma eventual lesão tecidual, a

partir da ativação de mecanismos que envolvem vias reflexas periféricas, espinhais e supra-espinhais (Julius e Basbaum, 2001).

Para o estudo do processo doloroso, é importante que se defina a diferença de quatro termos relacionados à dor: nocicepção, dor, sofrimento e comportamento doloroso. A nocicepção refere-se ao estímulo nocivo originado do receptor sensitivo. Esta informação é conduzida para o SNC pelos neurônios aferentes primários. A dor é uma sensação desagradável percebida pelo córtex, geralmente, como resultado de um impulso. O sofrimento refere-se à reação do ser humano diante da percepção da dor. Quando a dor é percebida pelo córtex, ocorre uma interação de diversos fatores como: experiências passadas, expectativa e atenção dirigida para a lesão. O comportamento doloroso refere-se às ações visíveis e audíveis do indivíduo para comunicar seu sofrimento aos outros (Okeson, 2006).

A dor pode ser considerada o quinto sinal vital, juntamente com a função cardiorrespiratória e térmica (Luna, 2006); além disso, é uma entidade biológica e psicológica. Atualmente, é vista muito mais como uma emoção do que unicamente uma sensação (Perl, 2011).

3.3 Tipos de Dor

A dor pode ser classificada segundo o tempo em que ocorre, bem como, de acordo com os fatores etiológicos que a originam. Mais comumente, a dor é dividida em três tipos: a primeira delas é aquela vista como um sistema de proteção fisiológico, essencial para detectar e minimizar os danos decorrentes de estímulos nocivos, bem como, para manter a integridade do corpo. Tal dor é conhecida como dor nociceptiva e, é sentida a partir de estímulos nocivos mecânicos, térmicos e químicos. O segundo tipo de dor

também é de proteção e de adaptação e, se refere à ativação do sistema imunológico por dano tecidual relacionado à inflamação, sendo conhecida, portanto, como dor inflamatória. A terceira se refere à dor não fisiológica, decorrente do funcionamento anormal do SNC ou SNP. Essa é chamada de dor patológica, que não é vista como um sintoma de uma desordem, mas, como um estado de doença. Enquanto a dor aguda tem papel biológico de manutenção da integridade do indivíduo, pois serve de alerta, a dor crônica não tem papel biológico, causando incapacidade e perda de qualidade de vida. Além disso, é uma experiência complexa que possui dimensões afetivas, cognitivas e motivacionais (Siqueira e Teixeira, 2003; Woolf, 2010, Lavigne e Sessle, 2016). A dor aguda é tipicamente associada a condições clínicas de rápida instalação, produzindo, algumas vezes, sintomas graves, em um curto período de tempo. Já, a dor crônica, tem duração maior do que três meses e segue seu curso, mesmo após o reparo tecidual (Okeson, 2006).

A classificação neurofisiológica da dor se divide em somática e neuropática. A somática pode ser superficial ou profunda. Com relação à dor orofacial, a superficial se refere à dor cutânea e mucogengival. A profunda compreende a dor visceral e a musculoesquelética. Dentre as dores viscerais, está a dor pulpar. Quanto à neuropática, a mesma ocorre de forma episódica ou contínua. Nesse tipo de dor, estão incluídas as alterações dolorosas relacionadas a lesões nervosas do SNC ou SNP. Tais lesões possuem as mais diferentes origens, dentre elas: metabólica, infecciosa ou medicamentosa (Okeson, 2006; Woolf, 2012; Von Hehn et al., 2012).

3.4 Fibras Sensitivas e Transmissão da Dor

O primeiro processo da nocicepção é a decodificação de sensações mecânicas, térmicas e químicas em impulsos elétricos, por terminais nervosos especializados, denominados nociceptores (Pisera, 2005; Sessle, 2011; Sessle, 2014).

Os nociceptores são terminações nervosas livres dos neurônios de primeira ordem, cuja função é preservar o equilíbrio tecidual, alertando sobre um dano potencial ou real. São responsáveis por transmitir o sinal nociceptivo da periferia para os neurônios secundários. Tais neurônios podem responder a múltiplas modalidades de estímulos, tais como mecânicos, químicos e térmicos; assim sendo, são descritos como polimodais. Além disso, são também considerados moléculas de sinalização bilateral, ou seja, os estímulos podem ser transmitidos tanto a partir de terminais nervosos periféricos, quanto centrais (Dubin e Patapoutian, 2010; Sessle, 2011, Sessle, 2014).

Os neurônios de primeira ordem são classificados em quatro grupos, segundo o diâmetro, o grau de mielinização e a velocidade de condução (Julius e Basbaum, 2001; Pisera, 2005; Okeson, 2006; Basbaum et al., 2009; Dubin e Patapoutian, 2010; Sessle, 2014; Peirs e Seal, 2016), como descrito a seguir:

(i) Fibras A α : possuem grande diâmetro (maior que 10 μm), são mielinizadas e de rápida condução. Estão relacionadas à propriocepção (Nair, 1995; Julius e Basbaum, 2001; Okeson, 2006).

(ii) Fibras A β : são fibras de diâmetro grande (maior que 10 μm), mielinizadas e de condução rápida, responsáveis por sensações inócuas. Na ausência de dano tecidual ou nervoso, as fibras A β somente transmitem informações referentes a estímulos inócuos, como tato, vibração e pressão. Porém, diante de dores crônicas também pode haver envolvimento dessas fibras (Basbaum et al., 2009; Sessle, 2014).

(iii) Fibras A δ : são de diâmetro intermediário (2 a 6 μm), mielinizadas. Sua velocidade de condução é intermediária, modulando a primeira fase da dor: mais aguda ou semelhante à pontada (Pisera 2005). Estudos eletrofisiológicos revelam que as fibras A δ podem ser sub-divididas em duas classes principais: as do tipo I, que são ativadas em temperaturas superiores a 50°C e transmitem estímulos químicos e mecânicos e, as do tipo II, capazes de responder a temperaturas mais baixas; porém, com limiar mecânico bastante elevado (Basbaum et al., 2009; Sessle, 2014).

(iv) Fibras C: são fibras de diâmetro pequeno (0,4 a 1,2 μm), não mielinizadas e de velocidade de condução lenta, responsáveis pela dor difusa, em queimação e persistente (Siqueira e Teixeira, 2003). As fibras C apresentam capacidades de respostas distintas conforme o estímulo. Tais fibras podem ser divididas em uma população peptidérgica (capazes de liberar neuropeptídeos, sendo sensíveis ao fator de crescimento neural; NGF) e, outra não-peptidérgica (respondem às neurotrofinas, neurturina, artemina e ao fator neurotrófico derivado da glia; GDNF, expressando uma série de receptores purinérgicos da série P2X (Basbaum et al., 2009).

Normalmente, a informação nociceptiva é transmitida por fibras do tipo C e A δ localizadas na pele, vísceras, vasos sanguíneos, peritônio, pleura, periósteo, tendões, fáscia, cápsula articular e fibras do músculo esquelético (Messlinger, 1997; Lamont e Tranquili, 2000). As fibras A δ são responsáveis pela primeira fase da dor, rápida e intensa e são sensíveis a estímulos mecânicos e térmicos. As fibras C produzem uma segunda fase de dor mais difusa e persistente e, representam, na periferia, receptores de alto limiar para estímulos térmicos e/ou mecânicos. Existem também fibras do tipo C polimodais que respondem a estímulos mecânicos, térmicos e químicos. Os campos receptivos destes neurônios variam entre 2 e 10 mm de diâmetro (Tranquili, 2004; Pisera, 2005;

Okeson, 2006; Sessle, 2011). Estudos atuais relatam que a ativação de nociceptores (fibras A δ e C) não precisa ocorrer para que haja sensação dolorosa. Isso se refere aos quadros de dor persistente, onde as fibras A β podem estar envolvidas (Basbaum et al., 2009; Vang et al., 2012). De forma interessante, as fibras nociceptivas podem ser distinguidas de acordo com a expressão de receptores que conferem sensibilidade seletiva ao calor, ao frio, a alterações de pH ou, a irritantes químicos (Basbaum et al., 2009; Peirs e Seal, 2016).

Para que ocorra a transmissão da dor, os estímulos nocivos são convertidos em estímulos elétricos nos neurônios aferentes. Isso ocorre a partir de potenciais de ação (PA), que ativam canais TRP (receptores de potencial transitório) e receptores purinérgicos. A membrana sináptica dos terminais pré-sinápticos contém grande quantidade de canais iônicos. Além dos canais de sódio e de potássio, os canais de cálcio também são expressos pelos neurônios sensitivos, podendo afetar muitos processos celulares com consequências variadas (Kuner, 2010; Sessle, 2011; Sessle, 2014).

Quando os neurônios aferentes são ativados na periferia por diferentes estímulos (inflamação, dano tecidual, pressão ou temperatura), PA são gerados nesses neurônios. Isso permite a transmissão do sinal doloroso pelo gânglio do trigêmeo (dor de origem orofacial) ou, pelo gânglio da raiz dorsal (dor proveniente de outros sítios), através de neurotransmissores. A liberação de neurotransmissores oriundos dos neurônios primários é afetada pela atividade dos canais iônicos pré-sinápticos. A excitabilidade dos nociceptores depende da natureza e extensão do estímulo, da expressão dos receptores e da presença dos canais iônicos (Miljanich et al., 2012).

A sinapse com o neurônio secundário é mediada, principalmente, por glutamato e peptídeos, como a substância P, por exemplo. A integração e o processamento sensorial

no gânglio do trigêmeo ou, no gânglio da raiz dorsal, podem levar à ativação de diversas vias de projeção para o cérebro. Por exemplo, o trato espinotalâmico lateral projeta ligações sensoriais multimodais dos neurônios de variação dinâmica com o tálamo lateral e tem sido implicado nos aspectos discriminativos e sensoriais da dor. Por outro lado, o aspecto medial do trato espinotalâmico, bem como, o trato espinoparabraquial projetado para o tálamo medial e estruturas límbicas medeiam os componentes emocionais da dor (Kuner, 2010; Dubin e Patapoutian, 2010; Miljanich et al., 2012). No gânglio do trigêmeo ou no gânglio da raiz dorsal, o sinal sensorial é amplificado (Sharif-Naeini e Basbaum, 2011; Miljanich et al., 2012). A sensibilização central envolve inúmeras estruturas cerebrais e é dependente de interações entre neurônios e células gliais (Pisera, 2005; Sessle, 2011).

Há três tipos específicos de neurônios de segunda ordem que transferem impulsos para os centros superiores. Eles são denominados de acordo com o impulso que transmitem. Os mecanorreceptores de baixo limiar (LTM) transmitem informações de propriocepção, pressão e toque leve. Os nociceptores específicos (NS) transmitem exclusivamente impulsos relacionados ao estímulo nocivo. O terceiro tipo é o neurônio de ampla faixa dinâmica (WDR); tal neurônio é capaz de responder a uma ampla faixa de intensidade de estímulos, de inócuos a nocivos (Okeson, 2006; Basbaum et al., 2009; Sessle, 2011).

3.5 Estruturas Límbicas

O sistema límbico compreende as estruturas circundantes ao cérebro e ao diencéfalo. As estruturas límbicas funcionam controlando as atividades emocionais e comportamentais. É composto pelas seguintes estruturas funcionais: corpo amigdalóide,

hipocampo, corpos mamilares, septo pelúcido, giro do cíngulo, cíngulo, ínsula e giro parahipocampal (Meneses, 1999; Machado, 2006; Okeson, 2006). O corpo amigdalóide atua no hipotálamo no controle do comportamento em cada tipo de situação social. O hipocampo interpreta para o encéfalo a maioria das experiências sensitivas. Se o mesmo determinar que uma experiência é importante, esta é armazenada como memória no córtex cerebral. Os corpos mamilares ajudam a controlar funções de vigília e bem-estar. O septo pelúcido, quando estimulado, pode causar efeitos comportamentais, incluindo sinais de agressividade. O encéfalo não é passivo às mensagens coletadas no meio externo e interno. Aspectos passados e presentes e, experiências pessoais, interagem de modo significativo para a percepção da dor (Siqueira e Teixeira, 2003; Okeson, 2006; Machado, 2006).

A geração de dor envolve muito mais do que componentes discriminativos sensoriais. Além disso, possui fatores cognitivos e emocionais complexos que são processados nos centros superiores do cérebro (Sharif-Naeini e Basbaum, 2011). Conseqüentemente, tem-se investigado as alterações nas regiões corticais do cérebro, incluindo o córtex cingulado anterior (ACC) e a amígdala, duas áreas que processam informações referentes ao componente emocional da dor (Neugebauer et al., 2003; Cao et al., 2009).

O ACC está envolvido na resposta afetiva do estímulo de dor. A ativação da MAP-quinase ERK (do inglês extracellular signal-activated kinase) tem papel importante na dor relacionada a emoções negativas (Cao et al., 2009). O aprendizado observacional do medo envolve o sistema de dor afetiva e o aumento da expressão de canais de cálcio Cav1.2 no ACC. Em um estudo clássico, um grupo de felinos foi submetido à estimulação elétrica das patas, enquanto outros somente observavam. O grupo dos observadores

apresentou um aumento das atividades neurais do ACC. Além disso, foi verificado que a deleção de canais de cálcio no ACC nos observadores reduziu as respostas comportamentais (Jeon et al., 2010). Um trabalho recente, conduzido por Smith et al. (2016) descreve a existência de uma relação complexa entre o ambiente psicossocial, a percepção e a experiência de dor. Tal estudo examinou a comunicação social da dor e demonstrou que camundongos espectadores, que estavam alojados na mesma sala em que roedores submetidos a dor inflamatória ou, à retirada da morfina, desenvolveram hiperalgesia. Os autores sugerem que o olfato pode ter mediado a transferência da hiperalgesia para os animais espectadores.

Tem sido descrito que a amígdala possui um papel importante na dimensão afetiva e emocional da dor, bem como, na sua modulação. Além disso, tal estrutura do sistema límbico está relacionada a algumas desordens, como medo aprendido, ansiedade e depressão (Neugebauer, 2015). Pesquisadores avaliaram o papel da amígdala em um modelo experimental de artrite em ratos. De forma interessante, as alterações nociceptivas associadas ao desenvolvimento da artrite foram relacionadas com um aumento da expressão de receptores metabotrópicos de glutamato do tipo I (subtipos mGluR1 e 5) na amígdala. Os autores investigaram esse grupo de receptores, já que os mesmos estão envolvidos em diversas alterações neuroplásticas em doenças psiquiátricas e neurológicas (Fundytus 2001; Neugebauer et al., 2003). Em um trabalho de revisão do mesmo grupo, foi sugerido que a divisão látero-capsular do núcleo central da amígdala pode ser definida como a amígdala nociceptiva, sendo responsável pela integração de informações de nocicepção com informações polimodais, tanto do ambiente interno, quanto externo do corpo. Dependendo das condições ambientais e do estado afetivo, a amígdala parece ter um papel dual de facilitação ou inibição da modulação dos

comportamentos de dor, estando implicada em diferentes níveis de transmissão da dor (Neugebauer et al., 2004).

Um estudo recente sugere que a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) na amígdala teria um papel importante na plasticidade fisiológica e em quadros de dor persistente. Após a injeção de veneno de abelha na pata esquerda de ratos, foi possível observar a ativação da amígdala do lado contralateral, como demonstrado pelo aumento do número de células positivas para c-Fos nos núcleos central e basolateral da amígdala. A administração de inibidores farmacológicos de NADPH oxidase ou de lipooxigenase, na amígdala direita, atenuou os comportamentos nociceptivos evocados pela injeção intraplantar de veneno de abelha. Dessa forma, os pesquisadores sugerem que a geração de ROS na amígdala pode representar um alvo importante para a modulação da dor (Lu et al., 2016).

Estados de dor crônica, incluindo aqueles que afetam a região orofacial, são frequentemente associados a comorbidades, como alterações de humor e ansiedade. De forma interessante, um estudo experimental realizado por Shang et al., (2015) demonstrou que camundongos submetidos à exposição da polpa dentária dos primeiros molares superiores apresentaram alterações de comportamento indicativas de ansiedade e fobia social, de acordo com a avaliação em diferentes paradigmas experimentais, através de mecanismos dependentes da ativação de vias inflamatórias e de canais de sódio voltagem-dependentes do subtipo NaV1.7. Este é um dos poucos estudos experimentais que explora a correlação entre dor pulpar inflamatória e distúrbios afetivos, o que sugere a necessidade de estudos adicionais nesse tema. Não obstante, não foram identificados trabalhos na literatura correlacionando dor pulpar com alterações da amígdala.

3.6 Dor Orofacial e pulpar

A dor orofacial tem peculiaridades importantes que devem ser consideradas. Em primeiro lugar, o sistema trigeminal tem papel fundamental na condução dos impulsos nociceptivos. A transmissão dos impulsos sensitivos, diferentemente de outras regiões do nosso corpo, ascende para o SNC a partir do gânglio trigeminal (Okeson, 2006; Sessle, 2000; 2005; 2014).

Os impulsos somáticos oriundos da face e das estruturas bucais transitam pela periferia, através do gânglio trigeminal, entrando pelo complexo nuclear sensorial trigeminal (Sessle, 1993; 2011). O trato espinhal trigeminal é dividido em três partes: subnúcleo oral, subnúcleo interpolar e na porção mais inferior, subnúcleo caudal. A maioria das sinapses de dor está no subnúcleo caudal, mas os aferentes da polpa dentária vão para os três subnúcleos (Sessle, 1986; 1993; 2000; 2005; 2009; 2014; Upadhyay et al., 2008; Chiang et al., 2011; Sessle, 2011).

A presença da inflamação pode gerar alterações nas vias periféricas e centrais da dor, dificultando ainda mais a resolução do quadro nociceptivo. Essas alterações não ocorrem somente ao nível funcional, mas também estrutural, envolvendo mecanismos de neuroplasticidade, onde um neurônio é capaz de mudar sua forma ou função diante de um estímulo. Além de alterações neuronais, também ocorre a ativação de células não neuronais, como as células da glia (Okeson, 2006; Kuner, 2010; Ji et al., 2013; Ji et al., 2016). No SNC, tais células são classificadas em astrócitos, microglia e oligodendrócitos. Em relação à dor orofacial, elas participam da sensibilização central, aumentando a resposta dos nociceptores aos estímulos, estando vinculadas a quadros de alodínia, hiperalgesia e dor referida (Chiang et al., 2011; Lavigne e Sessle 2016; Ji et al., 2016). No sistema nervoso periférico, as células satélites e as células de Schwann são capazes de

liberar diversos neurotransmissores e fatores de crescimento, que podem influenciar a atividade dos neurônios (Chiang et al., 2011; Lavigne e Sessle 2016; Ji et al., 2013; 2016). Ademais, é preciso considerar o papel potencial de outras células não-neuronais na dor, incluindo células endoteliais, macrófagos perivasculares e linfócitos T que migram para o SNC (Grace et al., 2014).

A polpa é um tecido conjuntivo frouxo especializado, bem vascularizado, de origem mesenquimal, localizado no interior da dentina radicular e coronária. Algumas alterações como inflamação e dor são singulares na polpa dentária, se comparadas a outros tecidos conjuntivos. Isso ocorre devido à impossibilidade de expansão que é impedida pelas paredes rígidas da dentina (Estrela e Figueiredo, 1999; Katchburian e Arana, 2004; Só e Scarparo, 2012). O tecido pulpar, por ser ricamente innervado, possui componentes importantes relacionados à transmissão de estímulos para o SNC. Fibras sensitivas provenientes do nervo trigêmeo e ramos simpáticos do gânglio cervical superior penetram através do forame apical e dos forames acessórios com grossos feixes. Esses feixes constituídos tanto por axônios mielínicos, quanto amielínicos, atravessam a polpa do canal radicular, chegando na câmara pulpar (Só e Scarparo, 2012). Ao alcançarem a polpa coronária, os axônios se abrem junto à camada odontoblástica, se dividindo em pequenos feixes, formando o plexo de Raschkow. Dentro do plexo, ocorre ramificação das fibras e sobreposição de campos receptores. Assim, as terminações dos axônios passam pelo odontoblastos como terminações nervosas livres (Nair, 1995; Hargreaves e Cohen, 2011). As fibras sensoriais na polpa possuem importante interação com os odontoblastos. Tais células, além da produção de dentina, estão envolvidas na transmissão da dor pulpar. Apesar de alguns estudos considerarem os odontoblastos células receptoras especiais, não há junções sinápticas entre elas e as terminações

nervosas. Através de interações parácrinas, os odontoblastos e as terminações nervosas pulpares parecem ter influência umas sobre as outras (Byers et al., 1982; Byers e Narhi, 1999; Hargreaves e Cohen, 2011).

O dente pré-molar humano, por exemplo, recebe cerca de 2300 fibras nervosas a partir do ápice radicular. Destas, aproximadamente 13% são mielinizadas (fibras A β e A δ), enquanto que 87% são amielinizadas (fibras C) (Nair, 1995). Há muitas fibras A δ e C na polpa dentária, com os axônios A δ terminando nos túbulos dentinários e, a terminação das fibras C na polpa propriamente dita (Fried et al., 2011).

Geralmente, a dor é sentida quando os sinais gerados por estímulos em fibras finas mielinizadas A δ ou não mielinizadas C chegam ao SNC. Entretanto, a inervação intrínseca do dente pode ser uma única exceção. Entre as poucas fibras A β , algumas podem ser nociceptivas, mas a maioria são LTM relacionados a sensações de pré-dor. Foi proposto que muitos aferentes relacionados à dor não são nociceptores, mas, mecanorreceptores de baixo limiar (Nair, 1995; Fried et al., 2011). A maioria dos neurônios aferentes da polpa, diferentemente de outros tecidos, perde a sua bainha de mielina logo após entrar na câmara pulpar. Como resultado de sensibilização central, os mecanorreceptores de baixo limiar podem evocar alodínia tátil (dor relacionada às fibras A β). Para os autores, existe dor por tais fibras em dentes saudáveis. Em função das terminações dos mecanorreceptores de baixo limiar, muitos aferentes dentinários respondem aos estímulos táteis ou térmicos não nocivos, levando à ativação de neurônios de segunda ordem no complexo trigeminal, evocando dor (Owatz et al., 2007; Fried et al., 2011).

De forma frequente, a dor pulpar aguda é de difícil localização; conseqüentemente, a identificação do dente afetado pode ser complexa. A causa da dor

aguda é o estímulo nocivo dos receptores pulpares. Cáries profundas, restaurações defeituosas, fraturas e erosão dentária podem ser fatores de agressão. A dor pode ser: (i) provocada (pulpite reversível) ou, (ii) espontânea (pulpite irreversível sintomática). A dor pulpar crônica ocorre quando o tecido pulpar lesado evolui de uma fase inflamatória aguda, para uma de duração prolongada, o que é observado nas pulpites crônicas. A inflamação na polpa ocorre num local de paredes rígidas; isso significa que o aumento do volume sanguíneo e intersticial vai ocasionar grande aumento na pressão hidrostática da polpa. Isso pode comprimir vasos sanguíneos e contrabalançar o aumento do fluxo sanguíneo. O fluxo sanguíneo da polpa durante a inflamação aumenta cerca de 200% (Katchburian e Arana, 2004; Okeson, 2006; Hargreaves e Cohen, 2011).

A inflamação pulpar pode ser induzida por estímulos físicos, químicos ou microbianos (Upadhyay et al., 2008; Hargreaves e Cohen, 2011). A resposta pulpar inflamatória é complexa e envolve a liberação de diversas classes de mediadores químicos. Dentre os mediadores oriundos de fibras nervosas destacam-se substância P, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), neurocinina A (NKA), neuropeptídeo Y, glutamato e trifosfato de adenosina (ATP), dentre outros (Caviedes-Bucheli et al., 2007; 2008; Ji et al., 2016). Outros mediadores são produzidos principalmente por células não-neuronais, incluindo bradicinina, serotonina, histamina, fator de necrose tumoral e prostaglandinas. Tais substâncias atuam na plasticidade dinâmica dos aferentes pulpares durante a resposta inflamatória, podendo mudar suas propriedades funcionais e fenotípicas. Essa plasticidade dinâmica contribui para os fenômenos de alodínia e hiperalgesia no processo inflamatório. Muitos desses mediadores podem agir nas terminações dos nociceptores, aumentando sua excitabilidade. Além disso, podem modular diversas classes de receptores e canais iônicos nas terminações nociceptivas,

através de mecanismos que envolvem segundos mensageiros intracelulares (Douglas, 1988; Katchburian e Arana, 2004; Caviedes-Bucheli et al., 2007; Hargreaves e Cohen, 2011; Sessle, 2011).

Os TRP são uma família de canais catiônicos não-seletivos, classificados em seis subtipos principais, denominados TRPC (canônico), TRPM (melastatina), TRPV (vaniloide), TRPA (anquirina), TRPP (policistina) e TRPML (mucopilina), com base na homologia da sequência de aminoácidos em mamíferos (Alexander et al., 2015). A expressão dos receptores TRP já foi descrita em diferentes estruturas relacionadas com a transmissão da dor orofacial (Sessle, 2011; Hargreaves e Ruparel, 2016; Basso e Altier, 2017). Dentro dessa classe de receptores, os subtipos mais estudados são TRPV1, TRPV2, TRPM8 e TRPA1, sensíveis a estímulos específicos, como calor, frio, substâncias pungentes e irritantes, além de estímulos mecânicos (Gerhold e Bautista, 2009; Gibbs et al., 2011). De forma interessante, foi demonstrada a presença de receptores TRPV1, bem como, TRPV2 em aferentes pulpaes, no gânglio trigeminal e em tecidos periodontais (Gibbs et al., 2011). Os canais TRPM8, além de serem expressos nos neurônios sensoriais trigeminais, estão presentes na mucosa oral, periodonto e fibroblastos da polpa (El Karim et al. 2011; Yajima et al., 2015). O TRPA1 apresenta papel crucial na geração e na manutenção da dor inflamatória pulpar (Gerhold e Bautista, 2009; Sessle, 2011). Tal receptor está presente nos axônios pulpaes, no corpo celular dos odontoblastos e nos fibroblastos do tecido pulpar (El Karim et al., 2011; Kim et al., 2012). Nas últimas décadas, vários estudos foram realizados a partir da aplicação de óleo de mostarda, um agonista de TRPA1, na polpa dentária. Através de estudos eletrofisiológicos e farmacológicos, esse modelo de dor orofacial aguda forneceu inúmeras respostas referentes aos mecanismos da dor pulpar inflamatória. Os trabalhos clássicos conduzidos com esse modelo mostraram que o óleo

de mostarda induz a sensibilização trigeminal central de forma aguda (com duração de 30 a 50 min), acompanhada por um aumento da atividade eletromiográfica dos músculos mastigatórios (para revisão ver: Sessle et al., 2011). Foram demonstradas evidências da relevância de receptores NMDA, P2X3 e P2X7 nos mecanismos de neuroplasticidade neuronal relacionados com esse modelo (Chiang et al., 1998; Park et al., 2001; Hu et al., 2002; Itoh et al., 2011).

Os receptores Toll-like (TLR) compreendem uma família de receptores especializados no reconhecimento de padrões moleculares associados a microorganismos, podendo ser ativados também por ligantes endógenos produzidos em resposta a estímulos estressores. Até o presente, foram identificados 11 membros diferentes de receptores TLR em mamíferos (TLR1-TLR11) (Bryant et al., 2015). Dentre esses receptores, um dos subtipos mais estudados é o TLR4, ativado principalmente por lipopolissacarídeos (LPS) presentes na parede celular de bactérias gram-negativas ou, por moléculas endógenas produzidas durante a inflamação, como a Hsp70 (*heat shock protein 70*). Os receptores TLR4 são ativados juntamente com o co-receptor CD-14. Sua ativação envolve o recrutamento da proteína adaptadora MyD88 (fator de diferenciação mielóide 88), com consequente estimulação de MAP-quinases e do fator de transcrição fator nuclear B (NF- κ B) (Asea, 2008; Verstrepen et al., 2008).

Um trabalho conduzido por Wadachi e Hargreaves (2006) demonstrou que nociceptores trigeminais positivos para TRPV1 expressam TLR4 e CD14. Além disso, os autores descreveram a presença de TLR4 e CD14 na polpa dentária coletada de pacientes com lesões cariosas, sugerindo que a dor secundária a infecções bacterianas pode ser resultante da estimulação de receptores TLR/CD14. Ampliando esses achados, Diogenes et al. (2011) demonstraram que a ativação dos receptores TLR4 pelo LPS, em neurônios

do gânglio trigeminal, resulta na sensibilização de receptores TRPV1 pela capsaicina. De forma interessante, a ocorrência de dor referida na língua, após a indução de inflamação pela aplicação do adjuvante completo de Freund (CFA) na polpa de ratos, foi prevenida pelo bloqueio dos receptores TLR4 no gânglio do trigêmeo (Ohara et al., 2013). Os autores sugerem que os receptores TLR4 podem estar sendo ativados pela Hsp70, produzida no tecido pulpar ou no gânglio do trigêmeo, em resposta ao CFA. Além disso, foi possível observar que a indução de pulpíte aguda, no modelo clássico de exposição da polpa à cavidade oral, levou ao aumento da expressão de TLR4 no gânglio trigeminal ipsilateral, após 24 h (Lin et al., 2015). No mesmo trabalho, foi demonstrado que a aplicação do antagonista TLR4, eritoran, no gânglio do trigêmeo, reduziu as respostas de reflexo de retirada da cabeça induzido por estimulação térmica ou mecânica, bem como, modificou parâmetros indicativos de dor no teste do campo aberto. Esse conjunto de evidências, reforça a hipótese de que a interação direta entre patógenos e neurônios é responsável por mediar as respostas dolorosas associadas com a infecção, o que pode ocorrer de forma independente da ativação de células imunes (Helley et al., 2015). Não obstante, é necessário ressaltar que a ativação de receptores TLR expressos por células não-neuronais, como as células da microglia, pode levar a um aumento dos níveis de citocinas, contribuindo ainda mais para os mecanismos de persistência da dor (Guo e Schluesener, 2007).

Muitos avanços foram obtidos nos últimos anos com relação aos mecanismos implicados na transmissão da dor de origem pulpar. O presente trabalho investigou mecanismos adicionais, comparando desfechos periféricos e centrais, em modelos distintos de dor pulpar inflamatória em ratos.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A dor é um fenômeno complexo que envolve mecanismos centrais e periféricos. O papel das células da glia nas diferentes condições de dor orofacial tem sido comprovado a partir de inúmeros estudos. Dentre eles, estudos eletrofisiológicos, moleculares e farmacológicos contribuíram fortemente para a elucidação dos mecanismos envolvidos na dor inflamatória de origem pulpar. O uso de inibidores da glia tem demonstrado diminuição de comportamentos nociceptivos, bem como, de mediadores químicos pró-inflamatórios que participam da interação neurônio-glia em diferentes condições de dor orofacial. Tal interação, tem sido relacionada a quadros de dores persistentes e à manutenção da sensibilização central (Chiang et al., 2011; Tsuboi et al., 2011).

A proposta inicial deste estudo foi avaliar os mecanismos centrais e periféricos num modelo de dor inflamatória crônica pulpar induzida pelo CFA. Nele, alterações comportamentais, como a diminuição da atividade locomotora do animal, três dias após a indução de dor pulpar inflamatória com CFA, sugerem comportamento nociceptivo. A tendência da diminuição do consumo de água (dia 8) e comida (dia 1) visualizada no presente estudo, apesar de não ser estatisticamente significativa, reforçou essa idéia. Apesar disso, tais respostas comportamentais não foram acompanhadas da ativação de astrócitos na amígdala, estrutura límbica importante na dimensão afetiva da dor. Esse achado trouxe curiosidades com relação à ativação da microglia nessa estrutura anatômica. Estudos mostram que a microglia pode ter sua ativação iniciada um dia após o dano do nervo sensorial trigeminal e que o máximo de tal ativação se dá em três dias, sendo mantida por mais 14 dias (Piao et al., 2006). Assim sendo, a microglia poderia estar sendo ativada previamente à ativação de astrócitos no modelo de dor estudado. Com relação aos mecanismos periféricos encontrados, cabe ressaltar a ativação das células

satélites gliais no gânglio trigeminal, três dias após a aplicação de CFA. Esse fato, permitiu questionamentos em relação à forma com que tais células estariam atuando nos neurônios sensitivos do gânglio trigeminal. Inúmeros fatores poderiam estar relacionados a tal ativação. A participação dos canais iônicos aumentando ou diminuindo a propagação do estímulo nervoso, a participação de neuropeptídeos e receptores purinérgicos e a liberação de citocinas por parte das células satélites poderiam estar aumentando a excitabilidade neuronal. Assim sendo, a realização de testes moleculares seria uma perspectiva interessante para o presente estudo contribuindo para o um melhor esclarecimento dessa questão.

A segunda etapa, executada durante o doutorado sanduíche, teve o objetivo de através de estudos eletrofisiológicos, verificar as alterações sensoriomotoras dentre outras alterações centrais, num modelo de dor pulpar aguda. Estudos pioneiros na Universidade de Toronto, demonstraram, a partir da aplicação de óleo de mostarda na polpa, a ocorrência da sensibilização central no sistema trigeminal. Essa descoberta, direcionou vários estudos buscando compreender os fenômenos de neuroplasticidade envolvidos nessa ocorrência.

Recentemente, na mesma Universidade, foi proposto um modelo de dor pulpar a partir da aplicação de lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano em polpas de ratos. Esses achados sugeriram que tanto o LPS, quanto óleo de mostarda, teriam comportamentos semelhantes nos registros eletromiográficos dos músculos mastigatórios, após aplicação dos mesmos na polpa dentária.

Partindo dessa premissa, foi sugerido que o uso desse modelo fosse então continuado. A partir de então, vários testes foram realizados na intenção de reproduzir

esse mesmo padrão de resposta sensoriomotora, após a aplicação de LPS, nos músculos estudados.

O primeiro teste foi realizado com o LPS oriundo de *P. aeruginosa* (1 mg/ml), na mesma concentração e cepa testadas pelo grupo. Esse ensaio possuía algumas diferenças com relação ao estudo já feito, como a posição do animal durante os registros de EMG, bem como, a anestesia e a posição da mandíbula durante o registro basal. Diante da frustrada tentativa de reproduzir os dados anteriores, optou-se por alterar alguns detalhes relativos ao experimento. Dentre as modificações realizadas, estão o tipo da anestesia, a posição do animal e a concentração do LPS.

Levando em consideração que existem diferenças entre o LPS de diferentes espécies bacterianas, optou-se pela utilização de LPS de *E.coli* (10 mg/ml), um agonista clássico de TLR4. Mesmo assim, não foi possível reproduzir o resultado anterior.

Foi então que se optou pela indução de dor pulpar através do modelo consagrado de aplicação de óleo de mostarda na polpa dentária. A Figura Suplementar 1 representa traços representativos das atividades eletromiográficas nos músculos mastigatórios após a aplicação de óleo de mostarda ou LPS na polpa dentária.

Os resultados demonstraram diferentes padrões de atividade sensoriomotoras entre o óleo de mostarda e o LPS. O óleo de mostarda produziu maior aumento das atividades eletromiográficas dos músculos estudados, em comparação ao LPS. Essa diferença foi constatada estatisticamente ($p < 0.05$ – ANOVA de duas vias seguido de Bonferroni). Baseado nos registros de EMG realizados, o modelo de aplicação de LPS na polpa, associado à avaliação da atividade eletromiográfica muscular imediata, não parece adequado. Por outro lado, a aplicação de LPS na polpa dentária, em outros paradigmas experimentais, parece trazer respostas interessantes sobre a dor pulpar inflamatória.

Huang et al. (2015) descreveram a importância dos receptores de opioides delta num modelo de pulpite aguda em camundongos induzida pela aplicação pulpar de LPS. Esse estudo descreveu um aumento da expressão dos receptores delta opioides, no gânglio trigeminal, 24 h após a aplicação pulpar de endotoxina bacteriana, enquanto que na polpa, a modulação deste receptor ocorreu em 6 horas. Talvez o tempo de avaliação empregado para o registro da atividade eletromiográfica, após a aplicação pulpar de LPS, possa explicar a ausência de efeitos marcantes sobre os músculos mastigatórios estudados. De fato, as respostas ao LPS dependem da ativação dos receptores TLR4, com consequente estimulação de fatores de transcrição e da síntese de novas proteínas. Esse processo requer um período de tempo maior, do que os 15 min empregados nos ensaios de eletromiografia, podendo justificar, em parte, os efeitos modestos observados no presente estudo.

Com base nos resultados apresentados, cabe discutir algumas perspectivas futuras. Com relação ao modelo do CFA, seria relevante investigar a expressão de mediadores da inflamação, como citocinas, no gânglio trigeminal, em diferentes intervalos de tempo. Ademais, caberia avaliar a possível ativação de astrócitos em outras estruturas relacionadas com os componentes emocionais da dor, em especial, no córtex pré-frontal. Não é possível descartar que outras alterações possam estar ocorrendo na amígdala, após a aplicação pulpar de CFA, como por exemplo, a produção de citocinas e a ativação da microglia. Outrossim, avaliação comportamentais adicionais seriam de grande importância, considerando a necessidade de modelos pré-clínicos para a avaliação de dor pulpar em animais conscientes, sem a necessidade de métodos invasivos.

Estudos moleculares e farmacológicos adicionais são necessários para melhor compreensão do complexo fenômeno da dor pulpar. O receptor TLR4 parece participar

de forma importante do processo álgico pulpar. Dessa forma, o conhecimento de suas vias de sinalização, bem como, suas interações com outros receptores poderão nortear pesquisas futuras na busca de fármacos efetivos no controle da dor dentária.

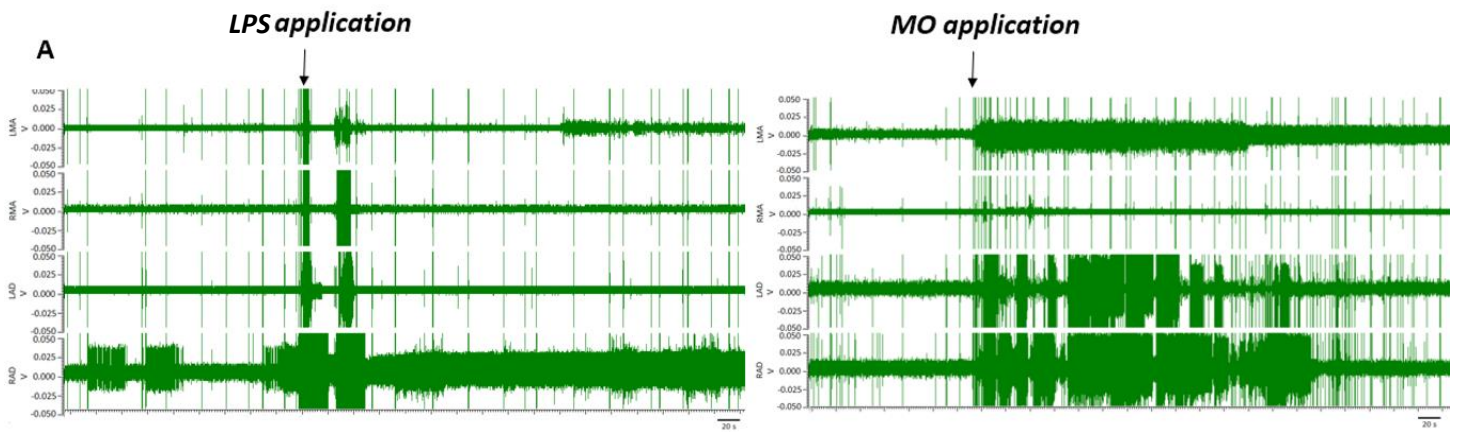


Figura suplementar 1: Examples of EMG traces following LPS (A) or MO (B) application into the right maxillary first molar pulp. RAD: right anterior digastric; LAD: left anterior digastric; RM: right masseter; LM: left masseter.

5 REFERÊNCIAS

- Alexander SP, Catterall WA, Kelly E, Marrion N, Peters JA, Benson HE, Faccenda E, Pawson AJ, Sharman JL, Southan C, Davies JA; CGTP Collaborators. The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2015/16: Voltage-gated ion channels. *Br J Pharmacol* 2015; 172(24):5904-41.
- Asea A. Heat shock proteins and toll-like receptors. *Handb Exp Pharmacol*. 2008; 183:111-27.
- Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* 2009; 139(2):267-284.
- Basso L, Altier C. Transient Receptor Potential Channels in neuropathic pain. *Curr Opin Pharmacol* 2017; 32:9-15.
- Bryant CE, Gay NJ, Heymans S, Sacre S, Schaefer L, Midwood KS. Advances in Toll-like receptor biology: Modes of activation by diverse stimuli. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2015; 50(5):359-79.
- Byers MR, Neuhaus SJ, Gehrig JD. Dental sensory receptor structure in human teeth. *Pain* 1982; 13:221-235
- Byers MR, Narhi MVO. Dental injury models: experimental tools for understanding neuro-inflammatory interactions and polymodal nociceptor functions. *Crit Rev Oral Biol Med* 1999; 10:4-39.
- Cao H, Gao YJ, Ren WH, Li TT, Duan KZ, Cui YH, et al. Activation of extracellular signal – regulated kinase in the anterior cingulate cortex contributes to the induction and expression of affective pain. *J Neurosci* 2009; 29(10):3307-3321.

Caviedes-Bucheli J, Gutierrez-Guerra JE, Salazar F, Pichardo D, Moreno GC, Munoz HRI.

Substance P receptor expression in healthy and inflamed human pulp tissue. *Intern Endod J* 2007; 40:106-111.

Caviedes-Bucheli J, Muñoz R, Azuero-Holguin MM, Ulate E. Neuropeptides in dental pulp:

The silent protagonist. *J Endod* 2008; 34 (7):773-788.

Chiang CY, Park SJ, Kwan CL, Hu JW, Sessle BJ. NMDA receptor mechanisms contribute to

neuroplasticity induced in caudalis nociceptive neurons by tooth pulp stimulation. *J Neurophysiol* 1998; 80:2621–2631.

Chiang CY, Dostrovsky JO, Iwata K, Sessle BJ. Role of Glia in Orofacial Pain. *Neuroscientist*

2011; 17(3): 303-320.

Diogenes A, Ferraz CCA, Akopian AN, Henry MA, Hargreaves KM. LPS Sensitizes TRPV1 via

Activation of TLR4 in Trigeminal Sensory Neurons *J Dent Res* 2011; 90(6): 759-764.

Douglas CR. *Fisiologia prática aplicada a odontologia*. São Paulo (SP): Pancast; 1988.

Dubin AE, Patapoutian A. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *The J Clin Invest*

2010; 120(11):3760-3772.

El Karim IA, Linden GJ, Curtis TM, About I, McGahon MK, Irwin CR, Killough SA, Lundy FT.

Human dental pulp fibroblasts express the "cold-sensing" transient receptor potential channels TRPA1 and TRPM8. *J Endod*.2011; 37(4):473-8.

Estrela C, Figueiredo JAP. *Endodontia: princípios biológicos e mecânicos*. São Paulo (SP):

Artes Médicas; 1999.

Fried K, Sessle BJ, Devor M. The paradox of pain from tooth pulp: low-threshold

“algoneurons”? *Pain* 2011; 152:2685-2689.

Fundytus ME. Glutamate receptors and nociception: implication for the treatment of

pain. *CNS Drugs* 2001; 15:29-58.

- Gerhold KA, Bautista DM. Molecular and cellular mechanisms of trigeminal chemosensation. *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1170:184-189.
- Gibbs JL, Melnyk JL, Basbaum AI. Differential TRPV1 and TRPV2 channel expression in dental pulp. *J Dent Res* 2011; 90(6):765-70.
- Grace PM, Hutchinson MR, Maier SF, Watkins LR. Pathological pain and the neuroimmune interface. *Nat Rev Immunol* 2014; 14(4):217-31.
- Guo LH, Schluesener HJ. The innate immunity of central nervous system in chronic pain: the role of Toll-like receptors. *Cell Mol Life Sci* 2007; 64(9):1128-36.
- Hargreaves K, Cohen S. *Cohen Caminhos da polpa*. 10ed. Rio de Janeiro (RJ): Elsevier; 2011.
- Hargreaves KM, Ruparel S. Role of Oxidized Lipids and TRP Channels in Orofacial Pain and Inflammation. *J Dent Res*. 2016; 95(10):1117-23.
- Hellebrekers LJ. *Dor em animais*. São Paulo (SP): Manole; 2002.
- Helley MP, Abate W, Jackson SK, Bennet JH, Thomson SWN. The expression of toll-like receptor 4,7 and co-receptor in neurochemical sub-populations of rat trigeminal ganglion sensory neurons. *Neurosci* 2015 (310) 686–698.
- Hu B, Chiang CY, Hu JW, Dostrovsky JO, Sessle BJ. P2X receptors in trigeminal subnucleus caudalis modulate central sensitization in trigeminal subnucleus oralis. *J Neurophysiol* 2002; 88(4):1614-24.
- Itoh K, Ching CY, Li Z, Lee JC, Dostrovsky JO, Sessle BJ. Central sensitization of nociceptive neuron in rat medullary dorsal horn involves purinergic P2X7 receptors. *Neurosci* 2011; 192: 721-73.

- Jeon D, Kim S, Chetana M, Jo D, Ruley HE, Lin SY, et al. Observational fear learning involves affective pain system and Cav1.2 Ca²⁺ channels in ACC. *Nat Neurosci* 2010; 13(4):482-488.
- Ji RR, Berta T, Nedergaard M. Glia and pain: Is chronic pain a gliopathy? *Pain* 2013; 154(01):S10–S28.
- Ji RR, Chamesian A, Zhang YQ. Pain regulation by non-neuronal cells and inflammation. *Science* 2016; 354 (6312),572-577.
- Jiang BC, Cao DL, Zhang X, Zhang ZJ, He LN, Li CH, Zhang WW, Wu XB, Berta T, Ji RR, Gao YJ. CXCL13 drives spinal astrocyte activation and neuropathic pain via CXCR5. *J Clin Invest* 2016; 126(2):745–761.
- Julius D, Basbaum AI. Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 2001; 413(13):203-213.
- Katchburian E, Arana V. *Histologia e Embriologia Oral*. 2ed. Rio de Janeiro (RJ): Guanabara Koogan; 2004.
- Kim YS, Jung HK, Kwon TK, Kim CS, Cho JH, Ahn DK, Bae YC. Expression of transient receptor potential ankyrin 1 in human dental pulp. *J Endod* 2012; 38(8):1087-92
- Klaumann PR, Wouk AFPF, Sillas T. *Patofisiologia da Dor*. *Arch Vet Sci* 2008; 3(1):112.
- Kuner R. Central mechanisms of pathological pain. *Nat Med* 2010; 16(11):1258-1266.
- Lamont LA, Tranquilli WJ. Physiology of pain. *Vet Clin North Amer* 2000; 30 (4):703-728.
- Lavigne GJ, Sessle BJ. *The Neurobiology of Orofacial Pain and Sleep and their Interactions*. *J Dent Res* 2016; 95 (10):1109-1116.
- Lin JJ, Du Y, Cai WK, Kuang R, Yang YX, Sun C, Li ZY, Kuang F Toll-like receptor 4 signaling in neurons of trigeminal ganglion contributes to nociception induced by acute pulpitis in rats. *Sci Rep* 2015; 5:12549

Loeser JD, Treede, RD. The kyoto protocol of IASP basic pain terminology. *Pain* 2008; 137 (3):473-477.

Lu YF, Neugebauer V, Chen J, Li Z. Distinc contributions of reactive oxygen species in amygdala to bee venom-induced spontaneous pain – related behaviors. *Neurosc Lett* 2016; 619:68-72.

Luna SPL. Dor, analgesia e bem-estar animal. ANAIS – I Congresso Internacional de Conceitos em bem-estar animal; 2006 Oct 12-19; São Paulo, Brasil; 2006. p.16-18.

Machado A. *Neuroanatomia funcional*. 2ed. São Paulo (SP):Atheneu; 2006.

Meneses MS. *Neuroanatomia Aplicada*. Rio de Janeiro (RJ):Guanabara Koogan; 1999.

Messlinger K. What is a nociceptor? *Anesthesist* 1997; 26(2):142-153.

Miljanich G, Rauck R, Saulino M. Spinal Mechanisms of Pain and Analgesia. *Pain Prac* 2012; 2(10):1-17.

Nair PNR. Neural elements in dental pulp and dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1995; 80:710-719.

Neugebauer V, Li W, Bird GC, Bhave G, Gereau RW. Synaptic plasticity in the amygdala in a model of arthritis pain: Differential roles of metabotropic glutamate receptor 1 and 5. *J Neurosci* 2003; 23(1):52-63.

Neugebauer V, Li W, Bird GC, Han JS. The amygdala and persistent pain. *Neuroscientist* 2004; 10(3):221-234.

Neugebauer V. Amygdala pain mechanisms. *Handb Exp Pharmacol* 2015; 227:261-84.

Ohara K, Shimizu K, Matsuura S, Ogiso B, Omagari D, Asano M, Tsuboi Y, Shinoda M, Iwata K. Toll-like receptor 4 signaling in trigeminal ganglion neurons contributes tongue-referred pain associated with tooth pulp inflammation. *J Neuroinflammation* 2013; 23;10:139.

Okeson J.P. Dores bucofaciais de Bell: Tratamento clínico da dor bucofacial. 6ed. São Paulo (SP): Quintessence; 2006.

Owatz CB, Khan AA, Schindler WG, Schwartz SA, Keiser K, Hargreaves KM. The incidence of mechanical allodynia in patients with irreversible pulpitis. *J Endod* 2007; 33(5):552-6.

Park SJ, Chiang CY, Hu JW, Sessle BJ. Neuroplasticity induced by tooth pulp stimulation in trigeminal subnucleus oralis involves NMDA receptor mechanisms. *J Neurophysiol* 2001; 85(5):1836-46.

Peirs C, Seal P. Neural circuits for pain: Recent advances and current views. *Science* 2016; 354(6312):578-584.

Perl E. Pain mechanism: a commentary on concepts and issues. *P Neurobiol* 2011; 94:20-38.

Piao ZG, Cho IH, Park CK, Hong JP, Choi SY, Lee SJ, Lee S, Park K, Kim JS, Oh SB. Activation of glia and microglia p38 MARK in medullary dorsal horn contributes to tactile hypersensitivity trigeminal sensory nerve injury. *Pain*. 2006 Apr;121(3):219-31.

Pisera D. Fisiologia da Dor. In: Otero PE. *Dor Avaliação e Tratamento em Pequenos Animais*. São Paulo: Interbook; 2005. p. 30 -74.

Sessle B.J. Recent developments in pain research: central mechanisms of orofacial pain and its control. *J Endod* 1986; 12:435-444.

Sessle BJ. Neural mechanisms implicated in the pathogenesis of trigeminal neuralgia and other neuropathic pain states. *J Am Pain Soc* 1993; 2:17-20.

Sessle, BJ. Acute and chronic craniofacial pain: brainstem mechanisms of nociceptive transmission and neuroplasticity, and their clinical correlates. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* 2000; 11:57-91.

- Sessle, B.J. Orofacial Pain. In THE PATHS OF PAIN 1975-2005, eds. H. Merskey, J.D. Loeser and R. Dubner, IASP Press, Seattle, pp. 131-150, 2005.
- Sessle, BJ. Mecanismos periféricos e centrais da dor orofacial e suas correlações clínicas' (Peripheral and Central Mechanisms of Orofacial Pain and Their Clinical Correlates). In: DOR: PRINCÍPIO E PRÁTICA, eds. Neto, O.A., Castro Costa, C.M., Siqueira, J.T.T., Teixeira, M.J., São Paulo, Brasil: Artes Médicas, pp. 189-204, 2009.
- Sessle, BJ. Peripheral and Central Mechanisms of Orofacial Inflammatory Pain. *Inter Rev Neurobiol* 2011; 97:179-205.
- Sessle, BJ. Orofacial Pain, IASP Press, Washington DC, 509 pp, 2014.
- Shang L, Xu TL, Li F, Su J and Li WG. Temporal dynamics of anxiety phenotypes in a dental pulp injury model. *Mol Pain* 2015; 11:40.
- Sharif-Naeini R, Basbaum AI. Chronic pain: Targeting pain where it resides in the brain. *Sci Transl Med* 2011; 3:1-4.
- Siqueira JTT, Teixeira MJ. Dor orofacial: Diagnóstico, terapêutica e qualidade de vida. Curitiba (PR): Editora Maio; 2003.
- Smith ML, Hostetler CM, Heinricher MM, Ryabinin AE. Social transfer of pain in mice. *Sci Adv* 2016; 2: e1600855.
- Só MV, Scarparo RK. Tratamentos conservadores da polpa. In: Coelho-de-Souza FH e cols. Tratamentos Clínicos Integrados em Odontologia. Rio de Janeiro (RJ):Revinter; 2012.
- Tsuboi Y, Iwata K, Dostrovsky JO, Chiang CY, Sessle BJ, Hu JW. Modulation of astroglial glutamine synthetase activity affects nociceptive behavior and central sensitization of medullary dorsal horn nociceptive neurons in a rat model of chronic pulpitis. *Europ J Neurosci* 2011 April; 34:292-302.

- Tranquilli WJ. Fisiologia da dor aguda. In: Greene SA. Segredos em anestesia veterinária e manejo da dor. Porto Alegre:Artmed; 2004. p. 399-402.
- Upadhyay J, Knudsen J, Andreson J, Becerra L, Borsook D. Non-Invasive Mapping of Human Trigeminal Brainstem Pathways. *Magn Reson Med* 2008; 60(5):1037–1046.
- Vang H, Chung G, Kim HY, Park SB, Jung SJ, Kim JS, et al. Neurochemical properties of dental primary afferent neurons. *Exp Neurobiol* 2012; 21(2):68 – 74.
- Verstrepen L, Bekaert T, Chau TL, Tavernier J, Chariot A, Beyaert R. TLR4, IL-1R and TNF-R signaling to NF-kappa B: variations on a common theme. *Cell Mol Life Sci.* 2008; 65(19):2964-78.
- Von Hehn CA, Baron R, Woolf CJ. Deconstructing the Neuropathic Pain Phenotype to Reveal Neural Mechanisms. *Neuron* 2012 Feb 23; 73(4): 638–652.
- Wadachi R, Hargreaves KM. Trigeminal Nociceptors Express TLR4 and CD14: A Mechanism for Pain due to Infection. *J Dent Res* 2006; 85(1):49-53.
- Woolf CJ. What is this called pain? *J Clin Invest* 2010; 120(11):3742-3744.
- Yajima T, Sato T, Hosokawa H, Kondo T, Saito M, Shimauchi H, Ichikawa H. Distribution of transient receptor potential melastatin-8-containing nerve fibers in rat oral and craniofacial structures. *Ann Anat* 2015; 201:1-5.

ANEXO A- Carta de aprovação pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de
Odontologia- PUCRS



Comissão Científica e de Ética
Faculdade da Odontologia da PUCRS

Porto Alegre 02 de outubro de 2013

O Projeto de: Tese

Protocolado sob n°: 0037/13
Intitulado: Alterações centrais após a indução de inflamação em polpas dentárias de ratos: mecanismos relacionados
Pesquisador Responsável: Prof. Dra. Maria Martha Campos
Pesquisadores Associados: Helena Fetter Filippini
Nível: Tese / Doutorado

Foi **aprovado** pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS em 02 de outubro de 2013

Este projeto deverá ser imediatamente encaminhado ao CEUA/PUCRS.

Profa. Dra. Luciane Macedo de Menezes
Coordenadora da Comissão Científica e de Ética da
Faculdade de Odontologia da PUCRS

ANEXO B- Carta de aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais/PUCRS



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, INOVAÇÃO E DESENVOLVIMENTO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Ofício 91/13 - CEUA

Porto Alegre, 07 de novembro de 2013.

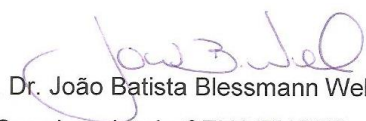
Prezado Sr(a). Pesquisador(a),

A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou a solicitação para alteração de modelo animal (de camundongos para ratos), datada de 22 de outubro, referente ao Protocolo de Pesquisa, registro CEUA 13/00362, intitulado **“Alterações centrais após a indução de inflamação em polpas dentárias de ratos: mecanismos relacionados”**.

Sua investigação, respeitando com detalhe as descrições contidas no projeto e formulários avaliados pela CEUA, está **autorizada** a partir da presente data.

Informamos que é necessário o encaminhamento de relatório final quando finalizar esta investigação. Adicionalmente, ressaltamos que conforme previsto na Lei no. 11.794, de 08 de outubro de 2008 (Lei Arouca), que regulamenta os procedimentos para o uso científico de animais, é função da CEUA zelar pelo cumprimento dos procedimentos informados, realizando inspeções periódicas nos locais de pesquisa.

Atenciosamente,


Prof. Dr. João Batista Blessmann Weber
Coordenador da CEUA/PUCRS

Ilma. Sra.

Profa. Maria Martha Campos

INTOX

Nesta Universidade

PUCRS

Campus Central

Av. Ipiranga, 6681 – P. 99 – Portal Tecnopuc – sala 1512

CEP: 90619-900 – Porto Alegre/RS

Fone: (51) 3353-6365

E-mail: ceua@pucrs.br

ANEXO C- Comprovante de submissão do manuscrito ao Periódico Physiology and Behavior

Ms. Ref. No.: PHB-D-17-00023

Title: Further evidence on the outcomes associated to CFA-induced tooth pulp inflammation in rats
Physiology & Behavior

Dear Dr. Campos,

Your submission, referenced above, has been assigned the manuscript number PHB-D-17-00023 and has been assigned to an Editor who will handle peer review.

Please note that in most cases at least two reviews may be required before a decision on a manuscript is made. You will be notified by e-mail each time a reviewer agrees to review your manuscript.

To track the progress of your manuscript, please log in to <http://ees.elsevier.com/phb/> and click on the "Submissions Being Processed" folder.

Your username is: MMCampos250274

Thank you for submitting your manuscript to Physiology & Behavior.

Kind regards,

Physiology & Behavior