



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
DOUTORADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

SANDRA REGINA BARRETTO

**ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E AVALIAÇÃO
HISTOMORFOLÓGICA DA FOTOBIMODULAÇÃO LASER
NA ARTICULAÇÃO TEMPOROMANDIBULAR DE RATOS**

ARACAJU

2013

SANDRA REGINA BARRETO **ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E AVALIAÇÃO HISTOMORFOLÓGICA DA FOTOBIMODULAÇÃO
LASER NA ARTICULAÇÃO TEMPOROMANDIBULAR DE RATOS** **2013**

SANDRA REGINA BARRETO

**ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E AVALIAÇÃO
HISTOMORFOLÓGICA DA FOTOBIOMODULAÇÃO
LASER NA ARTICULAÇÃO
TEMPOROMANDIBULAR DE RATOS**

Tese apresentada ao Núcleo de Pós-Graduação
em Medicina da Universidade Federal de
Sergipe como requisito parcial à obtenção do
grau de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Rigoldi
Bonjardim

ARACAJU

2013

Barreto, Sandra Regina
B273a Atividade antinociceptiva e avaliação histomorfológica da fotobiomodulação laser na articulação temporomandibular de ratos/ Sandra Regina Barreto; orientador: Leonardo Rigoldi Bonjardim. -- Aracaju, 2013.
139f. il.

Tese (Doutorado - Ciências da Saúde - Núcleo de Pós-Graduação em Medicina) – Universidade Federal de Sergipe, 2013.

1. Articulação temporomadibular 2. Carragenina 3. Formalina 4. Dor orofacial
5. Lasers em Odontologia. I. Bonjardim, Leonardo Rigoldi, oriente. II. Titulo

CDU 616.314-009.7

SANDRA REGINA BARRETO

**ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E AVALIAÇÃO
HISTOMORFOLÓGICA DA FOTOBIMODULAÇÃO
LASER NA ARTICULAÇÃO
TEMPOROMANDIBULAR DE RATOS**

Tese apresentada ao Núcleo de Pós-Graduação em Medicina da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde.

Aprovada em: 16/07/2013

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Rigoldi Bonjardim

1º Examinador: Profa. Dra. Maria Amália Gonzaga Ribeiro

2º Examinador: Prof. Dr. Luiz Carlos Ferreira da Silva

3º Examinador: Profª Drª Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior

4º Examinador: Prof. Dr. Márcio Roberto Viana dos Santos

PARECER

DEDICATÓRIA

“O amor de mãe por seu filho é diferente de qualquer outra coisa no mundo. Ele não obedece lei ou piedade, ele ousa todas as coisas e extermina sem remorso tudo o que ficar em seu caminho.”

Agatha Christie

*Não dedico esse trabalho a minha filha **Nathalia Barreto dos Santos** simplesmente pelo fato de ser sua mãe, mas pela maturidade com que soube esperar a realização de um sonho (desejo) que obviamente não era seu, mas que incorporou como sendo, fazendo parte dele não somente como observadora, mas atuando de verdade, ficando ao meu lado para que eu estivesse perto, acreditando e confiando para que eu não desistisse; deixando-me ser egoísta e muitas vezes distante, mas me mostrando na sua sabedoria infantil, que para termos algo precisamos muitas vezes, aprendermos a “abrir mão”. Não foi à toa que minha vida mudou quando ela nasceu, encontrei alguém que passou a ser minha referência, minha razão, meu amor; alguém que me faz lembrar que tenho que me esforçar para ser melhor a cada dia, mesmo sendo simplesmente EU. Te Amo muito minha filha e rogo a Deus que permita que você seja cada vez mais VOCÊ!*

“Os filhos não precisam de pais gigantes, mas de seres humanos que falem a sua linguagem e sejam capazes de penetrar-se o coração.”

Augusto Cury

*Dedico também aos meus Pais: **Marlene e José Valdon Barreto**, exemplos de amor e de vida! Que me fazem reconhecer em cada momento a importância que eu tenho em suas vidas, me lembrando da gratidão, do amor e do respeito imensos que me fazem mais próxima de quem eu amo, minha família! Talvez esteja longe de ser a filha perfeita que vocês merecem, mas tenham a certeza de que no meu jeito de ser, vocês ocupam a melhor parte de mim! Vejo na força de vocês a minha força; vejo nas suas rugas a minha vida contada com amor e dedicação! Talvez a felicidade não exista da maneira que gostaríamos que ela se apresentasse diante de nós, mas por certo, o meu caminhar seria mais difícil e minha vida seria menos feliz se não pudesse contar com os seus passos diante dos meus a servir como referência! Vocês são muito mais que parte da minha vida...vocês são a minha própria vida! Amo vocês demais!*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

“Na certeza de que Estás comigo, vejo no obstáculo a transpor não a dificuldade que tolhe minha vontade, mas a oportunidade que me concedes para crescer.”

Minha autoria

A Deus mestre maior e minha fonte de inspiração, que em sua misericórdia me concedeu a graça de uma encarnação próspera mesmo nas limitações. Que me faz ver a cada dia o compromisso não somente com as almas afins, mas principalmente com aqueles que me desafiam a consciência e o silêncio! Obrigada Pai por não desistir de acreditar em sua filha imperfeita, mas Esteja certo, agradecida!

“Se não puderam ser as mãos que compartilharam comigo a labuta, foram o pensamento, o sorriso e o afago que me lembravam a todo o tempo que eu não estava sozinha”

Minha autoria

Aos meus irmãos **Patrícia e Luciano Barreto**, que me fazem lembrar sempre que na graça de viver reside a presença de quem está sempre ao nosso lado; companheiros que são na construção do meu EU. Partilhar com vocês mais uma vitória me faz mais consciente do quanto fazem parte da minha vida, o quanto não posso dissociar a minha felicidade da minha família! Somos absolutamente diferentes; três almas que tiveram a oportunidade de se encontrarem, para favorecer uns aos outros a alegria de caminhar não somente juntos, mas unidos! Obrigada pela compreensão e pelo carinho que me fizeram ainda mais perseverante e determinada em minha jornada! Amo, Amo e ...Amo!!

“...Um menino caminha; e caminhando chega no muro; e ali logo em frente a esperar pela gente, o futuro está...”

Trecho da música Aquarela; Autor: Toquinho

Aos meus sobrinhos, não os meus futuros, mas os meus três presentes: **Letícia Barreto da Silva** (Lelê), **Gabriel Barreto da Silva** (Biel) e **Arthur Machado de Farias Barreto** (Tucão) que me lembram de sorrir, na loucura de uma vida corrida que também necessita de descanso, de alegria. Alegria propiciada pelo sorriso e carinho de cada um. Vocês não têm ideia do quanto fazem da minha vida uma razão especial; um motivo a mais para ser feliz! Que Deus os abençoe para que sejam mais felizes do que vocês me fazem ser! Bjs, “queijos” e o meu amor!

“A gente não faz amigos, reconhece-os.”

Vinícius de Moraes

À minha cunhada, **Larissa Machado de Farias Barreto** (Lala) parte importante e integrante de minha família, presença sempre marcante em minha vida, em momentos bons e não tão bons! Hoje mais unidas pelo nascimento de Arthur que surgiu de uma união verdadeira e que vem trazer ainda mais felicidade e exigir o compromisso aqueles que optaram por se doarem em prol de algo maior! Na caminhada os nossos passos se cruzam na certeza de podermos contar uma com a outra...sempre!

A **Prof. Dra. Maria Amália Gonzaga Ribeiro** (Amalinha, minha AMIGA) perdi a contas de quantas vezes eu solicitei a tua ajuda em desespero e alcancei as suas mãos a me fortalecer o passo e a vontade! Amiga de sempre, colega incansável, exemplo de persistência, culpada por hoje estar absolutamente convencida e contaminada pelas suas ideias! Creio que seja essa a tradução da “paixão pelo que se faz”, a crença no novo e no aparentemente impossível, a se traduzir em fatos e verdades pelo trabalho incessante! Devo-lhe mais essa, espero poder pagar com o meu carinho e admiração, além da labuta incansável no caminho a ser trilhado! Obrigada por tudo!

Aos meus Anjos da Guarda: **Genecy Calado de Melo, José Cleveilton dos Santos, Makson Gleydson Brito de Oliveira, Thauam Gomes Meneses, Marcus Vinícius Porto Souza, Rafael Andrade Mota, Profa. Rose Nely Pereira Filho, Profa**

Dra. Isabel Bezerra Lima Verde por me mostrarem na simplicidade da doação de si mesmos, que nada se faz sozinho; que nenhum passo é dado sem que se conheça e se compartilhe caminhos; que as vitórias são favorecidas pela força da união. Se me fosse concedida a graça de traduzir em palavras os meus agradecimentos, pela renúncia em meu favor; pelos sacrifícios em nome de um trabalho e sonho que não lhes pertencia, muito provavelmente nenhuma palavra ou sequer gestos seriam suficientes. Então ficam os meus sentimentos de profunda gratidão e amor eternos a quem por suas atitudes e desvelo me fizeram enxergar o quanto precioso é contar com amigos. Obrigada meus Anjos sem Asas!

Com imensa satisfação estendo os meus agradecimentos a **Gladiston Luis Santos de Jesus, Max Wesley Santos Hora e Marcos Antônio dos Santos** (Biotério da UNIT) três almas generosas que tornaram possível a realização desse trabalho, entendendo as minhas necessidades e favorecendo cada etapa dessa pesquisa. A Gladston em particular agradeço pelas mensagens positivas e incentivadoras que guardei em meu coração, como mais um estímulo dentre os muitos que Deus me permitiu ter. Muito obrigada por tudo! Mas lembrem: ainda não acabou!

Agradecimento especial às três mosqueteiras: **Suzane Jacinto Rodrigues Grubisik** (Su), **Tatiana Souza de Oliveira** (Taty), **Bárbara Lima Simioni Leite** (Bá) amigas em essência, que se calaram quando tiveram que fazê-lo, que participaram todas as vezes que solicitadas, que torceram para que tudo desse certo. Com o coração se fizeram presentes em minha vida e permitiram que eu pudesse caminhar, e ao D'Artagnan, meu chefe e amigo, **Prof. Dr. Guilherme de Oliveira Macedo**, que teve também parte muito importante do desenrolar dessa pesquisa, especialmente, na etapa final e mais conturbada da confecção do trabalho me apresentando soluções importantes (programas estatísticos); permitindo-me concentrar no meu trabalho, mesmo em meio às confusões da coordenação, que sabemos: são demasiadas e, ainda, ficando feliz com a minha felicidade. Muito obrigada! Que Deus abençoe todos vocês!

Ao **Prof. Dr. Alexandre de Albuquerque Franco** (meu amigo Xande, com demasiado orgulho!), um homem de brilho próprio e que mesmo em seu fausto é capaz de ser humilde, afável, acessível e humano. Vê-lo brilhar me enche de júbilo porque reconheço o seu esforço e sua dedicação incessantes e neles me inspiro. Os frutos de hoje, então, estão na exata medida de um homem labutador e incansável que não se

resume a glórias, porque não são os seus objetivo, mas aos resultados, consequência de um trabalho que não esgota e de uma competência sem par e que por isso, melhora a cada dia. Obrigada pelo seu apoio de amigo-irmão, pela sua alegria com as minhas realizações e por se fazer presente em uma torcida inesgotável desde o início dessa jornada.

À **Verônica Oliveira Conceição** (Vê), uma amiga de vidas que reencontrei e que segue comigo na luta, nas convicções e nas certezas. Somos mães de filhos diferentes unidos pelo sangue, que temos responsabilidades e pretensões semelhantes a qualquer uma mãe: a de ver os nossos filhos felizes; o que nos une além desse fato é a certeza de que podemos contar uma com a outra, nos auxiliando nos momentos difíceis e compartilhando os alegres, mesmo com a distância física interposta entre nós. Saiba amiga que rogo sempre a Deus que te proporcione forças para superar as dificuldades e seguir em frente na conquista da felicidade que nos é possível.

A todos que compartilharam comigo essa caminhada que não foi mais sofrida porque vocês estavam nela: a **Tamara Gomes Marinho** e **Marcus Ricardo Santos Lima Melo** (preciosos ao estarem comigo quando precisei abrir caminhos); **A Prof. Dr. Marcos Paulo Rosa Barbosa** (responsável pela elaboração da planta da caixa para observação comportamental); **Profa Dra. Renata Marinho, Prof. Dr. José Mirabeau de Oliveira Ramos, Profa. Dra. Marise do Vale Simon, à minha turma (pequena) do Doutorado**, ao **Prof. Dr. Enilton Aparecido Camargo** e **Profa Danielle Gomes Santana** (sempre atenciosos e prestativos ao compartilhar o seus saberes), **Ao Prof. Hesmone de Santa Rosa** (permitiu que eu pudesse labutar enquanto a UNIT descansava e confiou em meu trabalho e competência); **À Elda Freire Lobo** (Eldinha) (que literalmente perdeu o descanso por minha causa, por várias vezes!), **Prof. Domingos Alves dos Anjos Neto** (o adorado perturbado) e **Prof. Dr. Paulo Almeida Jr.** (o “Padre”) (ambos me ampararam em momentos, para que eu literalmente não caísse); **Profa. Juliana Ribeiro Lopes** (My eternal English schoolmistress); **Aos funcionários do curso de odontologia, meus amigos do coração:** Neidinha, Dona Flor, Catinha, Tony, Tenisson, Cláudio, Thais, Vera, Emanuel, Alarcon, Seu Antônio, Thiago, Dona Cida, Cláudinha*, Rita, Patrícia, Maria Luíza, Daiane; e **Aos meus companheiros do Centro Espírita: Francisco Cândido Xavier** (a força que auxiliou a serenar o meu espírito inquieto).

AGRADECIMENTO AO MEU ORIENTADOR

PROF. DR. LEONARDO RIGOLDI BONJARDIM

“As pessoas entram em nossa vida por acaso, mas não é por acaso que elas permanecem.”

Lilian Tonet

Ao **Prof. Dr. Leonardo Rigoldi Bonjardim** um mestre por excelência! Agradeço-te porque sei do grande desafio que foi acreditar em alguém com ideias tão opostas e que talvez não houvesse conseguido enxergar de imediato a profundidade da batalha que estava por vir! Mesmo assim, não deixou de estar presente quando solicitado, mostrando a grandeza de quem no observar é capaz de enxergar muito além do que é possível ver! Não sei se isso é capaz de retratar a profundidade de sentimentos tão complexos, mas por certo me deu condições de poder trilhar um caminho não me esquecendo de quem eu sou e em que acredito! Sentirei saudades do mestre que no silêncio me fez reafirmar a vontade de crescer e de mostrar do que sou capaz, de me superar! Minha gratidão e eterno carinho! Que Deus te abençoe na nova caminhada que já vislumbro de muito sucesso! Orarei sempre por você para que favoreça outras pessoas a encontrarem o seu caminho ou quem sabe, novas formas de caminhar! Fica com Deus e não se esqueça daqueles que aqui cativastes...para sempre!

AGRADECIMENTO MAIS QUE ESPECIAL

AO PROF. DR. RICARDO LUIZ CAVALCANTI DE ALBUQUERQUE Jr.

“A amizade é uma predisposição recíproca que torna dois seres igualmente ciosos da felicidade um do outro.”

Platão

Talvez não tenhamos a noção exata do que seja a amizade, mas por certo reconhecemos o amigo verdadeiro em cada adversidade, quando olhamos para o lado e percebemos que a multidão foi embora, e somente permaneceu ao nosso lado, aquele que por certo não nos abandonará.

Em todos os momentos da minha jornada no Doutorado, você foi a mão estendida, o ouvido atento, o ombro disponível e a voz forte a calar em Minh’ alma a necessidade de seguir em frente...de não desistir. Motivos talvez eu tivesse para isso, mas como fazê-lo se havia alguém a acreditar, a torcer, a esperar, mais até do que eu conseguia fazê-lo, lembrando-me do compromisso assumido e da necessidade de continuar?

Hoje mais do que nunca sei que posso confiar em mim, pois encontrei alguém que me permitiu ver a mim mesma e acreditar que seria possível. Se não tive tempo de te agradecer fica a certeza de que nunca o esquecerei; que você será lembrado em minhas orações e na minha mais profunda gratidão.

Não sei se isso é amizade, não sei se seria a melhor pessoa a compreendê-la, porque muitas vezes fui ausente, na primazia das minhas necessidades e objetivos! Mas sei que nas minhas mais profundas elucubrações não conseguia defini-la melhor do que tendo você ao meu lado, sendo a referência pelo exemplo, pela dedicação e competência, marcas de um ser humano que se distingue dos demais, ciente de que não há mal algum em ter orgulho no que se faz e em quem se é, balaústre na ciência e pela ciência que nos ensina a ver caminhos quando nada parece ter mais sentido diante do desespero que muitas vezes nos assola, mostrando que resultados não são frutos de premeditações, mas da seriedade com que se conduz o trabalho, como à própria vida: **OBRIGADA MESTRE, ORIENTADOR...MEU AMIGO!**

EPÍGRAFE

“Aquele cuja visão é limitada pelo orgulho ou pelo preconceito e não compreendem esses desejos ansiosos de nossos pensamentos, ávidos de conhecimentos, que atirem sobre tal gênero de estudos o sarcasmo ou o anátema! Nós erguemos mais alto as nossas contemplações!”

Camille Flammarion- século XIX

“Nós somos aquilo que fazemos repetidamente. Excelência, então, não é um modo de agir, mas um hábito.”

Aristóteles (filósofo grego)

RESUMO

ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E AVALIAÇÃO HISTOMORFOLÓGICA DA FOTOBIOMODULAÇÃO LASER NA ARTICULAÇÃO TEMPOROMANDIBULAR DE RATOS. SANDRA REGINA BARRETO. NÚCLEO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA (NPGME) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE-ARACAJU/SE. 2013.

A Desordem temporomandibular (DTM) é uma disfunção que afeta a articulação temporomandibular (ATM), sendo caracterizada principalmente pela presença de dor. Tem sido demonstrado que fototerapia laser de baixa potência (FLBP) apresenta efeitos analgésicos e anti-inflamatórios em casos de DTM, mas ainda são escassos os estudos experimentais que permitam compreender os mecanismos envolvidos nesta atividade biológica. Sendo assim, o propósito desse trabalho foi avaliar a capacidade da FLBP em controlar a dor e a inflamação induzidas na ATM de ratos com diferentes agentes químicos. Para isso, foi realizado um estudo em duas etapas. Na primeira, foi induzida nocicepção com formalina a 2,5% na ATM de 25 ratos Wistar (325 ± 25 g), que foram então distribuídos aleatoriamente em 05 grupos (n=5): CRG (sem tratamento); DFN (tratados com diclofenaco sódico); LST1 (tratado com FLBP 12,5 J/cm²); LST2 (tratado com FLBP 52,5 J/cm²) e LST3 (tratado com FLBP 87,5 J/cm²). A FLBP foi realizada em única aplicação, com laser diodo GaAlAs a 780 nm. Os animais foram avaliados em relação aos comportamentos de levantar a cabeça (LC), coçar a face (CO), analisados separadamente e somados os comportamentos. Os dados foram analisados por meio de teste Anova (uma via) e teste de Tukey. Na segunda etapa, foi induzida inflamação na ATM de 45 ratos Wistar (325 ± 25 g) com carragenina a 1%. Posteriormente, os animais foram divididos em 03 grupos principais (n=15): CRG (sem tratamento), DFN (tratados com diclofenaco sódico) e LST2 (tratado com FLBP 52,5 J/cm²). A FLBP foi realizada a cada 48 h, com laser diodo GaAlAs a 780 nm. Em 24 h, 3 e 7 dias, cinco animais de cada grupo foram randomicamente eutanasiados e os espécimes de ATM foram processados e corados com hematoxilina/eosina (HE). Foi realizada análise descritiva das alterações morfoestruturais e semiquantitativa da intensidade da resposta inflamatória e neoformação vascular. Os dados foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis e extensão *post-hoc* de Dunn. Os resultados demonstraram que o DFN, o LST2 e o LST3 significativamente reduziram as respostas nociceptivas caracterizadas pela soma dos comportamentos de LC e CO ($p<0.001$). DFN também foi capaz de reduzir os comportamentos de LC ($p<0.05$) e CO ($p<0.01$) quando avaliados separadamente, da mesma forma que o LST2 (LC e CO, $p<0.001$). O LST1 não apresentou efeito antinociceptivo. Na análise histológica, foi observada uma infiltração inflamatória significativamente mais intensa in CRG do que em DFN e LST2 em 24 h ($P<0.05$ e $p<0.001$), 3 dias ($p<0.01$ e $p<0.001$) e 7 dias ($p<0.001$ e $p<0.01$). Além disso, o contingente de neutrófilos foi mais conspícuo em CRG do que nos demais grupos em 24 h. A neoformação vascular se apresentou menos expressiva em CRG do que DFN ($p<0.001$) e LST2 ($p<0.001$) em 24 h, enquanto que em 3 dias, LST2 exibiu maior quantitativo de vasos sanguíneos que CRG ($p<0.001$) e DFN ($p<0.001$). Em 7 dias, não houve diferença no conteúdo vascular entre os grupos ($p>0.05$). Baseado nos resultado pôde-se concluir que a FLBP apresentou atividade antinociceptiva e anti-inflamatória na indução realizada na ATM de animais experimentais.

Descritores: Articulação temporomandibular, Carragenina, Formalina, Dor orofacial, Lasers em Odontologia.

ABSTRACT

ANTINOCICEPTIVE ACTIVITIE AND HISTOMORPHOLOGICAL EVALUATION OF LOW-LEVEL LASER PHOTOBIMODULATION IN RATS' TEMPOROMANDIBULAR JOINT. SANDRA REGINA BARRETTO. NÚCLEO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA (NPGME) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE-ARACAJU/SE. 2013.

Temporomandibular Disorder (TMD) is a dysfunction that affects the temporomandibular joint (TMJ), characterized primarily by the presence of pain. It has been shown that low level laser therapy (LLLT) presents analgesic and anti-inflammatory effects in cases of TMD, but still experimental studies are scarce in order to understand the mechanisms involved in this biological activity. Therefore, the purpose of this work was to evaluate the ability of LLLT to control pain and inflammation induced by different chemical agents injected in the rat's TMJ. A study was carried out in two steps. At first induction of nociception was performed with 2.5% formalin in 25 Wistar rats' ATM of 25 (300 ± 50 g), which they were randomly divided into 05 groups (n=5): CRG (no treatment); DFN (diclofenac sodium); LST1 (LLLT 12,5 J/cm²); LST2 (LLLT 52.5 J/cm²) and LST3 (LLLT 87.5 J/cm²). The LLLT was performed in a single application, with the apparatus laser with 780 nm (GaAlAs diode laser). The animals were evaluated considering the nociceptive behaviors characterized by rubbing the orofacial (RO) region and flinching the head (FH) quickly, analyzed separately and summed the behaviors. Data were analyzed through Anova test (one way) and Tukey's test. In the second stage, inflammation was induced in the TMJ of 45 Wistar rats (300 ± 50 g) with carrageenan to 1%. Then, the animals were divided into 03 main groups (n=15): CRG (no treatment); DFN (diclofenac sodium) and LST3 (LLLT 52.5 J/cm²). The LLLT was performed every 48 h, with the laser device described above. At specific times (24 h, 3 days and 7 days) five animals from each group were randomly sacrificed and their TMJ specimens were processed and stained with hematoxylin/eosyn (HE). The data were submitted to descriptive analysis regarding to semiquantitative and morphostructural changes and emphasizing the inflammatory aspects and vascular neoformation. Data were analyzed through Kruskal-Wallis test and Dunn's *post-hoc* test. The results showed that DFN, LST2 and LST3 significantly reduced nociceptive responses characterized by the sum of the behaviors of FH and RO ($p<0.001$). DFN was also able to reduce the behaviors of FH ($p<0.05$) and CO ($p<0.01$) when assessed separately, as well as it was observed in LST2 (FH and RO, $p<0.001$). The LST1 did not elicit nociceptive effect. In the histological analysis, an inflammatory infiltration was observed significantly more intense in CRG than in DFN and LST2 in 24 h ($P<0.05$ e $p<0.001$), 3 days ($p<0.01$ e $p<0.001$) and 7 days ($p<0.001$ e $p<0.01$). In addition, the contingent of neutrophils was more conspicuous in CRG than in other groups in 24h. The vascular neoformation was less expressive in CRG than DFN ($p<0.001$) and LST2 ($p<0.001$) in 24 h, while in 3 days, exhibited greater quantitative LST2 blood vessels than CRG ($p<0.001$) and DFN ($p<0.001$). In 7 days, there was no difference in vascular content between experimental groups ($p>0.05$). Based on the results, one might conclude that the LLLT showed anti-inflammatory and antinociceptive effect in the inflammation induced in the TMJ of animals.

Key-words: Temporomandibular Joint, Carrageenan, Formalin, Orofacial Pain, Lasers in Dentistry.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- Distribuição dos animais experimentais de acordo com o tipo de tratamento preconizado para realização da avaliação antinoviveptiva.....	51
TABELA 2- Descrição dos parâmetros da FLBP aplicados aos grupos irradiados.....	52
TABELA 3- Distribuição dos animais experimentais de acordo com o tipo de tratamento preconizado para realização da avaliação histomorfológica.....	57

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- Imagem mostrando a caixa utilizada para a realização das avaliações das respostas nociceptivas. Diâmetro da caixa 30x30x30 cm, sendo três paredes laterais e o piso da caixa todos recobertos por espelhos e um dos lados com vidro removível para permitir a observação do animal ...	49
FIGURA 2- Aparelho Laser diodo semi-condutores GaAlAs, (Twin Laser-MMOptics® - São Carlos-SP-Brasil).....	51
FIGURA 3- Imagem mostrando a presença do corante azul de Evans confirmando a indução com a formalina na área da ATM.....	55
FIGURA 4- Imagem das etapas de preparação do material para análise histomorfológica.....	59
FIGURA 5- Avaliação da resposta antinociceptiva nos grupos experimentais.....	62
FIGURA 6- Secções histológicas coradas em HE dos grupos experimentais em 24h.....	63
FIGURA 7- Secções histológicas coradas em HE dos grupos experimentais no período de 03 dias.....	64
FIGURA 8- Secções histológicas coradas em HE dos grupos experimentais no período de 07 dias.....	65
FIGURA 9- Avaliação da resposta inflamatória e do padrão de vascularização nos grupos CRG, DFN e LST2 durante os 03 períodos analisados.....	66

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19-20
2. REVISÃO DE LITERATURA	21-46
2.1 DESORDEM TEMPOROMANDIBULAR (DTM)	21-23
2.2 DOR NA REGIÃO OROFACIAL	23-26
2.3 INFLAMAÇÃO E REPARO	26-31
2.4 INFLAMAÇÃO E REPARO NA ATM	31-34
2.5 TERAPIA COM FOTOBIMODULAÇÃO COM LASER DE BAIXA POTÊNCIA	34-35
2.6 EFEITO ANALGÉSICO DA FOTOBIMODULAÇÃO COM LASER DE BAIXA POTÊNCIA (FLBP)	35-37
2.7 EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DA FOTOBIMODULAÇÃO COM LASER DE BAIXA POTÊNCIA (FLBP)	37-39
2.8 MODELOS EXPERIMENTAIS PARA AVALIAÇÃO DA DOR E INFLAMAÇÃO	39-41
2.9 FORMALINA	41-44
2.10 CARRAGENINA	44-45
2.11 UTILIZAÇÃO DA FOTOBIMODULAÇÃO COM LASER DE BAIXA POTÊNCIA EM MODELOS EXPERIMENTAIS PARA AVALIAÇÃO DA DOR E INFLAMAÇÃO	45-46
3. OBJETIVOS	47
3.1 OBJETIVO GERAL	47
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	47
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	48-60
4.1-AVALIAÇÃO DA RESPOSTA ANTINOCICEPTIVA	48-54
4.1.1 Submissão ao Comitê de Ética e Pesquisa	48
4.1.2 Seleção dos espécimes amostrais	48
4.1.3 Procedimentos gerais	48
4.1.4 Preparação dos animais para a indução com formalina	49
4.1.5 Indução da nocicepção com Formalina	49-50
4.1.6 Tratamentos e procedimentos utilizados	50-52

4.1.7 Avaliação da resposta antinociceptiva	52-54
4.2-AVALIAÇÃO HISTOMORFOLÓGICA	54-59
4.2.1 Seleção dos espécimes amostrais	54
4.2.2 Procedimentos gerais	55
4.2.3 Anestesia dos animais experimentais	55-56
4.2.4 Indução da inflamação com Carragenina	56
4.2.5 Tratamentos e procedimentos realizados	56-57
4.2.6 Divisão dos subgrupos	57-58
4.2.7 Análise histomorfológica	58-59
4.3-ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS	59-60
4.3.1- Avaliação Antinociceptiva	59
4.3.2- Avaliação Histomorfológica	59-60
5. RESULTADOS	61-66
5.1 AVALIAÇÃO ANTINOCICEPTIVA	61
5.2 AVALIAÇÃO HISTOMORFOLÓGICA	62-66
6. DISCUSSÃO	67-76
7. CONCLUSÃO	77
8. PRODUÇÃO CIENTÍFICA	78-80
REFERÊNCIAS	81-94
APÊNDICE A: Ficha para acompanhamento da avaliação nociceptiva.	95-96
APÊNDICES B	97-99
APÊNDICE B-1: Ficha para acompanhamento da avaliação das etapas decorrentes da indução com carragenina	97
APÊNDICE B-2: Ficha para acompanhamento da avaliação das etapas decorrentes da indução com carragenina e tratamento com diclofenaco sódico	98
APÊNDICE B-3: Ficha para acompanhamento da avaliação das etapas decorrentes da indução com carragenina e tratamento com LST2	99
ANEXO A: Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa	100
ANEXO B: ARTIGO PUBLICADO: Improvement of dermal burn healing by combining sodium alginate/chitosan-based films and low level laser therapy	101-110
ANEXO C- ARTIGO SUBMETIDO E COMPROVANTES DA	

SUBMISSÃO: Evaluation of antinociceptive and anti-inflammatory activity of low-level laser therapy on TMJ inflammation in rodents	111-128
ANEXO D- NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA JOURNAL OF PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY A: BIOLOGY	129-139

1 INTRODUÇÃO

Disfunções na articulação temporomandibular (DTMs) é uma expressão genérica que caracteriza um grupo de condições crônicas e dolorosas que envolvem tanto a articulação temporomandibular (ATM) quanto os músculos da mastigação e estruturas associadas, sendo que, frequentemente, apresentam um componente inflamatório (GOULART et al., 2005; DE LEEUW, 2012). Afetam aproximadamente 12% da população em geral (DWORKIN et al., 1990), tendo a dor como um dos sintomas mais comuns e, usualmente, a razão que leva o indivíduo a buscar ajuda profissional (TING et al., 2007; BAGIS et al., 2012).

Tem sido relatado que os objetivos principais dos tratamentos propostos para os pacientes diagnosticados com DTM são produzir alívio da sintomatologia dolorosa, reduzir a sobrecarga adversa, permitir melhora nos movimentos mandibulares, restaurando a função articular e mandibular. Além disso, favorece o retorno às atividades diárias normais do paciente, melhorando a sua qualidade de vida (DE LEEUW, 2012).

As drogas anti-inflamatórias não-esteroidais (AINES) aparecem como uma das principais opções rotineiramente utilizadas pelos pacientes para o alívio da dor provocada pelas DTMs. Essas drogas inibem uma ou mais das isoformas das ciclooxigenases que limitam a produção e liberação de prostaglandinas, um mediador químico intimamente associado à indução de dor de origem inflamatória (GOTZSCHE, 2000; SCHAILLE, EBERSBERGER, VON BANCHET, 2002). Contudo, a utilização crônica desses fármacos pode produzir efeitos colaterais indesejáveis, especialmente, complicações gástricas e renais (ISHIMARU et al., 2003).

Na tentativa de encontrar soluções efetivas para os problemas inflamatórios e álgicos associados às DTMs e com menores efeitos colaterais sobre o organismo, outras opções de tratamento têm sido propostas, como é o caso da fotobiomodulação Laser de baixa potência (FLBP).

A FLBP tem sido bastante utilizada no tratamento coadjuvante de condições álgicas da ATM por promover a redução da sintomatologia dolorosa causada pelo deslocamento da mandíbula em suas atividades funcionais, através da ação analgésica e anti-inflamatória. Esta atividade biológica ocorre pela produção aumentada de β -endorfinas e pelo controle das prostaglandinas, reduzindo diretamente a dor local, ao mesmo tempo em que reduz a contração da musculatura pela bioestimulação das fibras dos músculos envolvidos no

processo. Concomitante, ainda promove relaxamento da musculatura por meio do restabelecimento da relação sódio/potássio (Na-K) causada pelo aumento do trifosfato de adenosina (ATP) (GENOVESE, 2007).

A ação anti-inflamatória e analgésica da FLBP tem sido bastante pesquisada na literatura e vêm demonstrando efeitos positivos sobre a inflamação e a dor em diferentes condições experimentais (SIMUNOVIC, 1996; FERREIRA et al., 2005; KARU, KOLYAKOV, 2005; FIKÁCKOVÁ et al., 2007; CARVALHO et al., 2010; CARVALHO et al., 2011; PALLOTTA et al., 2012). Contudo, os resultados clínicos disponíveis ainda são bastante controversos, especialmente, quando se leva em consideração o grande número de diferentes protocolos com indicação para serem utilizados nas desordens dolorosas e inflamatórias verificadas na ATM (CARVALHO et al., 2011; DA SILVA et al., 2012).

Embora os efeitos da terapia com laser (TL) para utilização em condições inflamatórias envolvendo articulações seja crescente, pesquisas enfocando os mecanismos da FLBP sobre condições inflamatórias da ATM ainda são escassas. Até o presente momento, havia-se registrado apenas único trabalho que analisou as alterações teciduais promovidas pela FLBP sobre a inflamação da ATM em modelo experimental (CARVALHO et al, 2011). Adicionalmente, nenhum trabalho foi publicado, até a presente data, analisando o efeito analgésico do laser sobre a sintomatologia dolorosa em ATM de roedores.

Desta forma é notório que existe uma necessidade e importância prementes em se elucidar os mecanismos biológicos associados à FLBP, particularmente no que diz respeito ao estudo de possíveis correlações entre a ação antinociceptiva e o efeito anti-inflamatório desta terapia sobre a inflamação na ATM. Sendo assim, o presente trabalho objetivou avaliar o efeito da FLBP sobre a sintomatologia dolorosa, bem como sobre as alterações teciduais inflamatórias da ATM, em modelo experimental murino.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DESORDEM TEMPOROMANDIBULAR (DTM)

A articulação temporomandibular é um dos componentes de um sistema complexo denominado “sistema estomatognático” que se vale da estabilidade anatômica e funcional de diferentes estruturas que o formam, quais sejam: dentes e estruturas anexas, ossos (mandíbula, maxila e crânio e hióide), lábio, bochecha, língua, saliva, músculos, sistema nervoso, vascular e linfático, além obviamente da articulação dantes citada (REHER, TEIXEIRA, 2001). Qualquer alteração de um desses componentes poderá, por conseguinte, resultar em mau funcionamento desse sistema.

A desordem temporomandibular nada mais é do que o resultado do desequilíbrio desse sistema, sendo definido como um subgrupo de desordens orofaciais, que envolve dor na região da ATM e/ou músculos mastigatórios, limitações dos movimentos mandibulares e presença de sons articulares (MAZZETTO et al., 2007; NOMURA et al., 2007), sendo reconhecida como a principal causa de dor orofacial de origem não-dental (NOMURA et al., 2007).

A etiologia é um dos aspectos relacionados à DTM que mais provoca controvérsias, uma vez que pode sofrer a ação direta ou indireta de vários fatores. Desta forma é lícito afirmar que a etiologia dessa desordem é de origem multifatorial, dentre as quais estão incluídos: a perda ou ao mau posicionamento dentário, estresse emocional, interferências oclusais, disfunções nos músculos mastigatórios e de estruturas adjacentes, alterações extrínsecas e intrínsecas na estrutura da ATM, bem como, a associação destes fatores (LERESCHE et al., 1997). Nesse ínterim, deve-se abrir um parêntese para o fato de que por muito tempo, as variações oclusais foram consideradas como sendo um fator etiológico primário da DTMs. Contudo, tem sido sugerido que os fatores oclusais associados às desordens na ATM, tais quais, overjet acentuado, mínimo overbite e mordida aberta anterior esquelética dentre outras, podem resultar de posição inadequada do côndilo da mandíbula como consequência de alterações intracapsulares associadas à doença (VANDERAS, 1994; DE LEEUW, 2012).

Deve-se enfatizar ainda os fatores genéticos que interferem na suscetibilidade a essa desordem articular, que apesar dos estudos ainda escassos, já sugerem haver relação entre o

polimorfismo da catecol-O-metil transferase, sensibilidade dolorosa e risco de desenvolver DTM (DIATCHENKO et al., 2005).

LeResche et al., (1996) chamaram a atenção para a alta prevalência de DTM no gênero feminino, especialmente na idade reprodutiva, sugerindo a participação de hormônios femininos na etiologia desta desordem. Bagis et al., (2012) em avaliação clínica também encontraram maior prevalência de DTM no gênero feminino. Por outro lado, em estudo realizado em adolescentes, a maior prevalência para o gênero feminino somente foi verificada em relação à sensibilidade do músculo pterigoideo lateral (BONJARDIM et al., 2005).

A etiologia variada atribuída à DTM causa dentre outros fatores a dificuldade no diagnóstico e, consequentemente, na determinação do correto tratamento, levando muitas vezes o paciente a longos e infrutíferos períodos de busca pela resolução do problema (DE LEEUW, 2012).

Em um estudo epidemiológico sobre os sintomas da DTM realizado na cidade de Ribeirão Preto/SP/Brasil, Gonçalves et al. (2010) encontraram que 39,2% dos indivíduos entrevistados apresentaram ao menos um sintoma de DTM, sendo a presença de ruídos na ATM o mais comum sintoma observado, seguido pela dor na articulação ou músculos mastigatórios. A dor acometeu em 25,6% da população. Nessa pesquisa as mulheres foram mais frequentemente afetadas do que os homens. Foi possível observar também, não haver risco aumentado de sintomas de DTM com o aumento da idade e, muito menos em relação ao gênero. Os autores concluíram que na população estudada os sintomas individuais de DTM, bem como, a combinação destes foram prevalentes na população urbana brasileira e mais frequente em mulheres.

Pacientes idosos parecem desenvolver sintomas mais intensos de DTM (ZUCCOLOTTO et al., 2007). Em trabalho realizado por Guarda-Nardini et al. (2012) foi observado que o avanço da idade nos pacientes determinou o diagnóstico de DTM degenerativas.

Tem sido relatado que a DTM também pode afetar crianças e pacientes jovens. Um estudo realizado em crianças finlandesas, na faixa etária entre 6 e 8 anos de idade mostrou que sinais de DTM e sintomas de dor são achados comuns nessa população, sendo os sinais clínicos da desordem significativamente mais altos entre crianças que apresentavam dor de cabeça, dor na região do pescoço-ombro ou dor nas costas, não tendo sido verificada influência do gênero nos resultados (VIEROLA et al., 2012).

Em pesquisa realizada por Bonjardim et al. (2005), foi encontrada elevada prevalência de DTM envolvendo adolescentes (12 a 18 anos). Os achados em crianças e pacientes jovens

suscitam a necessidade da prática da realização de diagnóstico precoce a fim de evitar o agravamento do quadro.

Os principais sinais clínicos atribuídos a DTM são: presença de sons articulares, sensibilidade na ATM e nos músculos relacionados, além de limitações nos movimentos mandibulares (SONMEZ et al., 2001). Já em relação aos sintomas relacionados à DTM, citam-se: céfaléia, otalgia, dor ou desconforto na mandíbula e bruxismo (RIOLO, BRANDT, TENHAVE, 1987). Dentro dessa perspectiva, Gray et al. (1994) ressaltaram que os sinais relacionados às DTMs estão presentes em 50 a 75% da população em algum momento da vida, enquanto uma taxa de 20 a 25% exibe sintomas leves da doença. Bonjardim et al. (2009) encontram alta prevalência de DTM, muito embora de suave intensidade em estudantes universitários, além de uma significativa associação dessa desordem com a ansiedade.

É importante frisar que a dor de cabeça e a DTM tem demonstrado uma forte associação causal. Troeltzsch et al. (2011) em avaliação realizada em 1031 indivíduos (436 homens; 595 mulheres; média de idade de 49,6 anos) buscando verificar a relação entre DTM, dor de cabeça e interferências oclusais, verificaram que fatores estomatognáticos relacionados às DTMs, parafunções, bem como, diferenças entre oclusão cêntrica e máxima intercuspidação superiores a 3 mm estão associadas à presença de dor de cabeça.

Dentre os sinais associados a essa desordem craniofacial, a dor aparece como um achado mais frequente (TING et al., 2007; BAGIS et al., 2012), determinando, na grande maioria das vezes, a busca por tratamento pelos pacientes, que varia de acordo com a severidade do quadro apresentado, desde a utilização de terapias físicas, como a utilização de analgésicos e anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), até mesmo a busca por tratamentos cirúrgicos, como opção para os casos mais severos (DE LEEUW, 2010).

Deve-se ressaltar que a dor na ATM, juntamente com a dor e fadiga muscular durante a realização dos movimentos da mandíbula podem contribuir para redução da atividade muscular e, por conseguinte, da força de mordida (LIU et al., 1999; KOGAWA et al., 2006), tornando esse sinal ainda mais relevante dentre os associados à DTM.

2.2 DOR NA REGIÃO OROFACIAL

A boca e a face são representativas de áreas das mais comuns dores verificadas no corpo (SESSLE, 1987). Algumas das dores observadas na região craniofacial podem se manifestar de maneira aguda ou transitória, como no caso das dores dentais e as dores de cabeça, que muitas vezes tem função biológica, servindo como um alerta para algo que esteja

acontecendo de errado com alguma parte do corpo e mesmo auxiliando no diagnóstico. Nas condições crônicas as dores podem persistir por vários meses ou mesmo anos, como é o caso das DTM's e da neuralgia do nervo trigêmeo, nesse caso, não existe evidência do papel biológico associado a esse quadro, outrossim, há um nítido comprometimento no componente emocional, físico e mesmo social do indivíduo afetado (SESSLE, 2000).

Fried et al., (2001) alertaram para o fato de que em algum estágio da vida o indivíduo sofrerá de alguma dor na face, dentes ou mesmo na maxila e/ou mandíbula, e guardadas as devidas proporções clínicas, essa dor poderá se tornar crônica, severamente debilitante e extremamente difícil de tratar.

Vários fatores etiológicos estão relacionados ao desenvolvimento de dor neuropática crônica na região orofacial, mas em especial a presença de dor persistente nessa região tem associação direta com injúria no sistema de nervo craniano, mas precisamente no nervo trigêmeo, devido a algumas características únicas atribuídas ao mesmo que pode contribuir para a resposta a injúria, como por exemplo: a origem embriológica do nervo, a proporção de fibras mielinizadas, amielinizadas e simpáticas presentes, a localização dos ramos do nervo no canal ósseo que o torna vulnerável a pressão, a ação de edema e mesmo deslocamento por ação de fragmento ósseo por fratura (FRIED et al., 2001).

A dor no sistema oral e craniofacial representa um dos maiores problemas de ordem médica e social (HARGREAVES, 2011), com um alto grau de prevalência na população. No Brasil, em estudo realizado em crianças com idade de 12 anos, encontrou-se uma prevalência de 66,6% de dor orofacial associada à alta prevalência de cárie em relação à população estudada (TRAEBERT et al., 2005).

A percepção da dor na região oral e craniofacial envolve mecanismos periféricos e centrais (RACICH, 2005), em um intrincado processo que tem início a partir do estímulo de fibras nervosas aferentes primárias que podem ser mielinizadas (fibras A-delta) ou amielinizadas (fibras C) e que são responsivas a estímulos nocivos, sendo que cada aferente nociceptivo termina perifericamente em receptores ou terminações nervosas livres denominadas de nociceptores (SESSLE, 1986).

O local determinado na pele, mucosa, ou mesmo em tecidos profundos a partir dos quais as fibras ou neurônios centrais podem ser excitados por um estímulo é chamado de campo receptivo da fibra ou do neurônio (SESSLE, 1986, SESSLE, 1999).

Os aferentes primários responsáveis pela inervação da região orofacial projetam-se no interior do cérebro e terminam centralmente no complexo nuclear sensorial do tronco cerebral trigeminal (CNST), que é subdividido no sentido rostro-caudal em: subnúcleo oral (SO),

subnúcleo interpolar (SI) e subnúcleo caudal (SC) (SESSLE, 1999; REN, DUBNER, 2011). Este último por possuir similaridades com o corno dorsal espinhal é denominado corno dorsal medular (REN, DUBNER, 2011).

As informações trazidas pelas fibras aferentes de pequeno diâmetro a partir dos tecidos craniofaciais como a ATM e músculos mastigatórios são transmitidas para as lâminas superficiais (I e II) e profundas (V e VI) do SC (SESSLE, 1999). Dessa maneira é factível atribuir ao SC o papel importante na transmissão da informação nociceptiva (HU, 1990), considerando-se a presença de três tipos de neurônios no seu interior: os neurônios mecanorreceptivos, responsivos a toque suave, pressão ou mesmo pelo movimento do cabelo na face (SESSLE, 1986), os neurônios específicos (NE) e neurônios de amplo alcance dinâmico (NAD), ambos classificados como neurônios nociceptivos, sendo que os NE são responsivos somente aos estímulos nocivos, portanto provenientes da condução de fibras aferentes de pequeno diâmetro, enquanto, os NAD respondem a estímulos táticos, assim como, a estímulos nocivos, provenientes da transmissão por fibras aferentes mecanosensitivas de maior diâmetro (A-beta) de condução rápida e de fibras de menor diâmetro (SESSLE, 2000).

Em relação aos componentes rostrais do CNST (SI e SO) é crível que desempenhem papel no mecanismo da dor que acomete as regiões: oral e intraoral (SESSLE, 1999).

A informação sensorial proveniente da região craniofacial segue direta ou indiretamente para o tálamo, e encontram em todas as suas partes formadoras (complexo ventrobasal, grupo posterior e áreas talâmica medial) como envolvidas em vários aspectos da transmissão da dor, muito embora, o papel funcional de cada parte não esteja bem esclarecido (SESSLE, 1986). Ambos, porção ventrobasal e medial do tálamo apresentam NE e NAD que recebem informações nociceptivas da região craniofacial. Devido ao fato do complexo ventrobasal apresentar propriedades semelhantes ao córtex cerebral somatosensorial acredita-se que essa região desempenhe o papel na dimensão discriminativa sensorial da dor, enquanto a porção medial do tálamo tem semelhança com a região do córtex cingulado anterior, o que possibilita exercer a função na dimensão afetiva e motivacional da dor (SESSLE, 1999).

Deve-se levar em consideração que tanto o sistema nervoso central quanto o periférico funcionam em ambos os níveis: consciente e inconsciente. A partir do sistema periférico a informação é levado ao sistema nervoso central pelos neurônios de primeira ordem; os neurônio de segunda ordem são responsáveis por levarem a informação até os centros mais elevados do cérebro, o trajeto dessas junção até o córtex cerebral é realizado pelos neurônios

de terceira ordem. Somente ao chegar no córtex cerebral é que a informação é traduzida em dor (RACICH, 2005).

Têm sido atribuídas a vários neuropeptídeos a modulação e a transmissão nociceptiva. Dentre eles pode-se citar a substância P, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, neuropeptídeo Y, polipeptídeo intestinal vasoativo, GABA (ácido gama amino butírico), serotonina (que variam de acordo com a localização da injúria no trajeto do nervo (FRIED et al., 2001; SESSLE, 2002).

2.3 INFLAMAÇÃO E REPARO

Na tentativa de se defender contra agressões que venham a desequilibrar as suas funções, o organismo se utiliza de mecanismos vários que objetivam a eliminação desses agressores e o retorno a homeostase. Esses mecanismos são nomeados como inflamação que poderia ser definida, mais precisamente, como uma resposta à infecção, a um desafio antigênico, bem como, a uma injúria tecidual que tem como propósito a eliminação de microrganismos ou agentes irritantes, potencializando o reparo tecidual (SHERWOOD, TOLIVER-KINSKY, 2004). Desta maneira, o processo inflamatório não deve ser visto como uma doença, mas sim, como uma defesa natural do organismo, desde que guardadas as devidas proporções, uma vez que inflamações ou respostas exacerbadas podem causar decomposição fisiológica, disfunção do órgão ou até mesmo levar o indivíduo à morte (SHERWOOD, TOLIVER-KINSKY, 2004; FLOWER, PERRETTI, 2005; CASTARDO, 2007).

Desde que foi primeiramente definida por Celsius no ano 1 dC, as características atribuídas à inflamação não modificaram significativamente, sendo assim, os reconhecidos sinais da inflamação, quais sejam: eritema, calor, edema e, dor permanecem e encontram explicações básicas na resultante da vasodilatação, acúmulo de leucócitos, aumento do fluido intersticial, além do estímulo das terminações nervosas por mediadores específicos (ALLER et al., 2007; CASTARDO, 2007).

Em uma classificação geral e simplificada, a inflamação divide-se, baseada especialmente na sua duração e eventos patológicos, em aguda e crônica. A inflamação aguda poderia ser definida como aquela que tem curta duração (horas a dias), sendo caracterizada por eventos exsudativos representados pela presença da vasodilatação, exsudação plasmática, migração de células, em especial e inicialmente pelos neutrófilos, para o local da injúria e, pela ativação da cascata de coagulação (SHERWOOD, TOLIVER-KINSKY, 2004). Em

relação à inflamação crônica a duração acontece de forma mais prolongada, podendo durar de semanas a anos; contudo a característica digna de nota é que eventos como: inflamação ativa, destruição tecidual e tentativa de reparo acontecem simultaneamente (SHERWOOD, TOLIVER-KINSKY, 2004).

A inflamação não é por si só, um evento simples. A complexidade dos eventos atribuídos e participativos da inflamação resulta dos inúmeros sistemas e mediadores envolvidos. Os eventos biológicos relacionados à inflamação aguda, como a vasodilatação, o aumento da permeabilidade vascular e a infiltração celular têm como componentes celulares primários os macrófagos, as células dendríticas, as células natural Killer (NK) e os neutrófilos (CASTARDO, 2007).

Nessa gama de agentes diretos e indiretos que participam do processo inflamatório, ressalta-se a participação dos mediadores químicos derivados das células. Inicialmente, indica-se a participação da histamina uma amina vasoativa, armazenada nas células como moléculas pré-formadas, sendo desta forma, um dos primeiros mediadores liberados durante a inflamação (KUMAR et al., 2010). Esta pode ser encontrada em diferentes células, mas em particular nos mastócitos, além dos basófilos presentes no sangue, e nas plaquetas. A histamina ainda age conjuntamente com outros mediadores inflamatórios participando da vasodilatação subsequente à vasoconstricção inicial (SHERWOOD, TOLIVER-KINSKY 2004; ALLER et al., 2006; CASTARDO, 2007; KUMAR et al., 2010). Quando em alta concentração, produz dor pelo estímulo direto dos neurônios sensoriais (DRAY, 1995).

Outros mediadores de importância são aqueles resultantes do metabolismo do ácido aracídônico (AA), dentre eles as prostaglandinas que são prostanoides resultantes da ação da enzima cicloxigenase (COX) sobre ácidos graxos, estando entre os mediadores mais potentes da hiperalgesia inflamatória. As prostaglandinas são produzidas por vários tipos de células, dentre elas: mastócitos, macrófagos, células endoteliais, dentre outras. Estes mediadores inflamatórios estão envolvidos em reações vasculares, além da inflamação sistêmica (KUMAR et al., 2010). Dentre as prostaglandinas de importância enfatiza-se a prostaglandina E₂ (PGE₂) um potente hiperalgésico que torna o tecido sensível a estímulos dolorosos, pela ação direta sobre os neurônios sensoriais (DRAY, 1995; KUMAR et al., 2010).

A produção das prostaglandinas é mediada pela classe de enzima COX, que está subdividida em duas isoformas, quais sejam: cicloxigenase 1 (COX-1) de natureza constitutiva e a cicloxigenase 2 (COX 2), que apesar de poder ser produzida de forma constitutiva, tem a sua expressão aumentada na inflamação, estando envolvida na patogênese de várias doenças inflamatórias (ALWANI et al., 2006; CARVALHO, 2008). A ação da

enzima COX acontece quando da liberação do AA dos fosfolipídios da membrana celular pela enzima fosfolipase 2; desta forma estando livre uma das formas enzimáticas da COX metaboliza o AA em prostaglandina (PESTILI DE ALMEIDA et al., 2001; CARVALHO et al., 2011).

É importante frisar que as prostaglandinas não comumente evocam dor quando injetados diretamente sobre a pele humana; o seu potencial algésico resulta da sensibilização de neurônios sensoriais reduzindo o limiar de ativação dos mesmos e aumentando a resposta destes neurônios a outros estímulos que induzem a dor (DRAY, 1995).

Durante o processo inflamatório, linfócitos e macrófagos ativados liberam outros importantes mediadores, identificados como citocinas, que vêm a ser pequenos polipeptídios ou glicoproteínas com potencial para a regulação de vários aspectos da imunidade e da inflamação (DRAY, 1995; ALLAN et al., 2006; ALWANI et al., 2006; KUMAR et al., 2010). É grande o número de citocinas já relacionadas que incluem várias das interleucinas (IL), interferons, fator de crescimento tumoral β (TGF- β), fator de necrose tumoral (TNF), além de quimiocinas adicionais (ALWANI et al., 2006).

A maioria das citocinas exerce efeito pró-inflamatório através da ação direta sobre receptores específicos presentes nas células alvo. Contudo, algumas destas, tais como IL1-Ra (antagonistas de receptores de IL1), TGF- β e alguns dos membros da IL-10 possuem atividade anti-inflamatória (SHERWOOD, TOLIVER-KINSKY, 2004; ALWANI et al., 2006; CASTARDO, 2007).

Dentre as citocinas pró-inflamatória a IL-1 β , IL-6 e TNF- α são as mais importantes dentre outros fatores por induzirem a hiperalgesia inflamatória afetando a excitabilidade de fibras sensoriais (DRAY, 1995). No local da inflamação, a TNF- α ainda é responsável por iniciar a resposta imune que ativa a defesa antimicrobiana e é responsável pelo início do reparo tecidual. A despeito dos benefícios dessa citocina, a sua liberação sistêmica poderá precipitar uma cascata de eventos que poderá resultar em injúria tecidual, disfunção orgânica ou mesmo morte (SHERWOOD, TOLIVER-KINSKY, 2004).

A IL-1 β tem potentes efeitos pró-inflamatórios, representados pela ativação dos linfócitos-T, pela proliferação das células B e pela produção de imunoglobulinas, produz ainda, febre, letargia, sono e anorexia, inibe a produção de albumina pelos hepatócitos e estimula a síntese de reagentes da fase aguda da inflamação; em ação conjunta com TNF- α estimula ainda a aderência celular endotelial de leucócitos através da regulação da expressão de moléculas de adesão (ALWANI et al., 2006).

A IL-6, assim como acontece com IL-1 β e TNF- α é produzida primariamente por macrófagos ativados, além de outras células inflamatórias ou estromais. Essa interleucina apresenta efeito local e sistêmico na inflamação incluindo: diferenciação de linfócitos-T, produção de imunoglobulinas, indução de febre e síntese de proteínas da fase aguda (ALWANI et al., 2006; KUMAR et al., 2010).

Ainda é importante ressaltar a participação de outro mediador químico da inflamação com efeito hiperalgésico, a bradicinina, formado a partir da cascata de coagulação por processamento enzimático do precursor cininogênio (DRAY, 1995), que pode ocorrer pelo estímulo de nociceptores a partir do tecido danificado (MIZUTANI et al., 2004). O edema, característica fundamental da inflamação aguda, também tem participação desse mediador químico que juntamente com a histamina (HS), substância P (SP), leucotrienos, componentes do complemento e fator ativador de plaquetas (FAP), atuam alterando de maneira intensa as funções da barreira dos pequenos vasos, aumentando a permeabilidade dos capilares e das vênulas à água e proteínas, facilitando a chegada de células, de anticorpos e proteínas da fase aguda ao local de lesão tecidual (SHERWOOD, TOLIVER-KINSKY, 2004; CASTARDO, 2007; KUMAR et al., 2010).

Outro importante mediador da resposta inflamatória é o óxido nítrico (NO), um gás solúvel produzido pelas células endoteliais a partir da L-arginina pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS) (DRAY, 1995; CASTARDO, 2007; KUMAR et al., 2010). É importante ressaltar que o NO exerce importante papel na vasodilatação por ação direta na musculatura lisa dos vasos, além de reduzir agregação e adesão plaquetárias (CASTARDO, 2007). Nos estados de normalidade, a produção de NO reduz o recrutamento de leucócitos, enquanto a diminuição dos níveis desse mediador inflamatório promove o aumento do rolamento e adesão leucocitária (KUMAR et al., 2010). É atribuído ao NO a capacidade de promover sensibilização dolorosa (VERGE et al., 1992), além de função microbicida, o que lhe confere participação na defesa do hospedeiro contra infecções (KUMAR et al., 2010).

O processo de cura, especialmente pelo reparo cicatricial, se segue à injúria tecidual como uma resposta biológica normal à agressão, sendo didaticamente dividida em três fenômenos típicos. O primeiro fenômeno advém da inflamação propriamente dita resultante da injúria direta do tecido, que como consequência, recruta do sangue, componentes e células inflamatórias como neutrófilos e macrófagos (fagocitose) que vão para o sítio injuriado objetivando eliminar bactérias, tecidos danificados e materiais estranhos ao local. O segundo fenômeno, caracteriza-se pela substituição das células fagocíticas por leucócitos mononucleares, linfócitos, além de células plasmáticas; outro ponto importante nessa fase é a

proliferação vascular (angiogênese) e a migração de fibroblastos para a área afetada com consequente depósito de nova matriz extracelular, bem como, de novas fibras colágenas. O último fenômeno corresponde à etapa de remodelamento do reparo cicatricial, quando as fibras colágenas depositadas no local injuriado assumem uma conformação reticulada e ganham uma espessura maior (MANDELBAUM, DI SANTIS, MANDELBAUM, 2003; MONACO, LAWRENCE, 2003; DIEGELMANN, EVANS, 2004).

O sucesso dos processos de regeneração e reparo teciduais depende diretamente da interação de células, bem como, dos componentes da matriz extracelular (MEC), estes últimos sendo representados por três grupos de macromoléculas, a saber: as proteínas estruturais fibrosas, dentre as quais se destacam os colágenos e as elastinas, responsáveis pela manutenção da resistência do tecido à tensão e retração do mesmo; as glicoproteínas adesivas, que conectam os elementos da MEC e estes às células; e por último, os proteoglicanos e o ácido hialurônico promotores de elasticidade e lubrificação aos tecidos. O mecanismo acima citado é complexo e resulta da ação de muitos fatores que se associam objetivando o mesmo fim, o reparo cicatricial (CARVALHO, RECCO-PIMENTEL, 2001, KUMAR et al., 2010).

Deve-se ressaltar, no entanto, uma etapa de primordial importância, a angiogênese que se caracteriza pela formação de novos vasos sanguíneos na área lesada, que pode acontecer a partir de vasos pré-existentes, assim como, através de células precursoras endoteliais (CPE). Independente da forma como os vasos neoformados aparecem, é flagrante a participação de componentes importantes que desencadeiam ou estimulam o processo, dentre os quais se citam: o Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF), o Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF), o Fator de Crescimento dos Fibroblastos (FGF) e o Fator de Crescimento Transformador- β (TGF- β) (KUAMAR et al., 2010; ELLMAN et al., 2013).

Dos fatores de crescimento citados, o VEGF configura-se como o mais importante estimulador da angiogênese fisiológica ou quando da ocorrência de inflamação crônica, nos tumores e na cura de feridas, sendo produzido pelas próprias células endoteliais, por várias células estromais. Dentre as funções exercidas por esse fator de crescimento encontram-se, além da promoção da angiogênese propriamente dita, o aumento da permeabilidade vascular, o estímulo da proliferação e da migração das células endoteliais, além da regulação da expressão endotelial de colagenases (KUAMAR et al., 2010).

O PDGF e o TGF- β participam do processo de estabilização dos novos vasos sanguíneos formados, uma vez que, logo depois de formados estes se apresentam frágeis. Já o FGF auxilia na estimulação da proliferação, diferenciação e migração das células endoteliais para o local da injúria tecidual (KUAMAR et al., 2010).

Em torno de 24 a 72 horas do início do reparo do tecido, e em consequência à proliferação dos fibroblastos e das células endoteliais, para o local da lesão, começa a ser formado um tecido com características especializadas, o tecido de granulação, que pela presença dos vasos neoformados e do aumento da permeabilidade vascular, é comum esse tecido apresentar-se associado a edema. A produção do tecido de granulação é diretamente proporcional a intensidade da inflamação e do defeito tecidual criado pela lesão, sendo esperado que em torno de 5 a 7 dias esse tecido preencha toda a área afetada (KUMAR et al., 2010).

A formação do tecido supracitado consiste em um marco referencial do reparo tecidual sendo caracterizado essencialmente pela grande formação de novos vasos sanguíneos, bem como, pela grande proliferação de fibroblastos. A importância da rica presença de vasos sanguíneos recém-formados na área tecidual reside no fato da relação direta existente entre vascularização e formação e manutenção do tecido formado, o que se justifica pela grande permeabilidade verificada nos vasos neoformados que garante o aporte de nutrientes variados, de células e de oxigênio para a área tecidual (KUMAR et al., 2010)

A formação e deposição do colágeno constituem outra etapa crucial no processo de reparo tecidual, sendo favorecidas pela angiogênese derivada do tecido de granulação, e pela substituição dos neutrófilos pelos macrófagos, células responsáveis pela produção de PDGF, TGF- β , FGF, EGF (Fator de Crescimento Epidérmico), além das citocinas IL-1 e TNF. Ambos os fatores estimulam a migração e/ou a proliferação de fibroblastos, que, por sua vez, são responsáveis pela produção dos diferentes tipos de colágenos (POON, HUANG, BURD, 2005; KUMAR et al., 2010).

A remodelação do tecido conjuntivo representa a fase final do reparo cicatricial onde ocorrem notórias alterações na composição da MEC, modulada por fatores dos crescimento que regulam a síntese de colágeno e de outras moléculas que participam da síntese de enzimas específicas responsáveis pela degradação dos componentes da MEC (metaloproteinases da matriz). Em resposta a essas alterações, existe uma pronunciada redução do número de vasos sanguíneos, e apoptose dos fibroblastos que por sua vez, resulta na produção de um tecido cicatricial com pouca densidade celular (CLARK, 1996; KUMAR et al., 2010).

2.4- INFLAMAÇÃO E REPARO NA ATM

A dor na articulação temporomandibular, frequentemente, é o resultado da instalação prévia de um processo inflamatório. A inflamação, por sua vez, gera uma série de alterações

que afeta em especial, o disco e a membrana sinovial em pacientes com DTM (WANG et al., 2012).

É fato inconteste que células inflamatórias desempenham um papel central no tecido sinovial inflamado podendo inclusive levar a danos na estrutura da articulação pela liberação de enzimas, de espécies de oxigênio reativo, bem como, de citocinas inflamatórias que degradam o tecido (DREIER et al., 2004; OGURA et al., 2010).

Já é conhecido que citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 β , TNF- α , além da IL-6 estão presentes no líquido sinovial nesses pacientes (MAYDANA et al, 2010), sendo assim, acredita-se que esses mediadores poderiam potencializar a degradação tanto do tecido ósseo quanto da cartilagem da articulação, além da inflamação da ATM através da indução da liberação de proteinases e do estímulo de mediadores inflamatórios (KANEYAMA et al., 2004; OGURA et al., 2010). Apesar disso, o mecanismo relacionado à infiltração de células inflamatórias capaz de definir alterações patológicas associadas às DTMs ainda não está bem esclarecida (OGURA et al., 2010).

Em estudo realizado por Takahashi et al., (1998) foi encontrado elevado conteúdo de IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α e IFN- γ no fluido sinovial em pacientes diagnosticados com osteoartrite e desarranjo interno do disco articular. Os autores chamam a atenção para o fato de que a IL-1 β foi associada à presença de dor e a hiperalgesia nos casos de DTMs. A IL-1 β participa da cascata inflamatória sendo responsável por iniciar e perpetuar a inflamação, que levará a destruição gradativa dos tecidos da ATM (LOBBEZOO et al., 2004; SPEARS et al., 2005). Sua liberação é provocada por ação inicial do TNF- α produzido pelas células do sistema imunológico, residentes ou que migraram para o local da injúria (VERRI et al., 2006; NAPIMOOGA et al., 2008).

Nas condições inflamatórias da ATM também é verificada a presença aumentada da enzima COX-2 (SATOH et al., 2009), especialmente em associação ao aumento dos níveis da IL-1 β ou do TNF- α (KOJIMA et al., 2003). Satoh et al., (2009) encontraram em seus resultados que a IL-1 β aumenta a síntese e liberação de PGE₂ via COX-2 em modelos de sinovites da ATM.

Kaneyama et al., (2004) observaram a presença de bradicinina no fluido sinovial de pacientes com DTM. Como já ressaltado, esse mediador inflamatório é um potente agente algésico, além do fato de que em grande quantidade é capaz de induzir a liberação de outros mediadores inflamatórios tais quais PGE₂, Leucotrienos, histamina e citocinas (CASSIM et al., 1997) .

No experimento de Ogura et al., (2010), o estímulo da sinovite induzida na ATM de ratos com a injeção de citocina pró-inflamatória (IL-1 β) induziu em 24 horas, alterações teciduais inflamatórias, tais como dilatação vascular, infiltração de células mononucleares, aumento da espessura da membrana sinovial e sintomatologia dolorosa.

O processo de reparo observado na ATM, embora ainda seja pouco elucidado, parece demonstrar características bem semelhantes aos demais tecidos. Assim, quando algum tipo de injúria, seja ela inflamatória, imunológica, mecânica ou bioquímica afeta a cartilagem, dá-se a origem a uma estimulação e, consequente, tentativa de reparo caracterizada pela proliferação celular, sendo essa fase relacionada diretamente com a produção de matriz extracelular por fatores de crescimento (IGF-1) (CONTI, VALLE, SCOLARO, 2001).

Nesse ínterim, ressalta-se o papel da síntese do colágeno associada ao processo de reparo na ATM. Deve-se lembrar que o colágeno é um importante elemento dessa articulação, sendo representado em sua maior parte pelo colágeno tipo I, muito embora o colágeno tipo II esteja presente em menor quantidade, contribuindo com as propriedades biomecânicas da cartilagem articular, especialmente aumentando a resistência às forças compressivas e de tensão (MIZOGUCHI et al., 1996; HUANG et al., 2003; DETAMORE et al., 2005). A produção de colágeno tipo II é aumentada nos casos de função anormal da cartilagem da ATM, o que de acordo com Huang et al., (2003), pode ser atribuída a uma resposta adaptativa frente ao esforço exagerado sofrido por essa articulação. Os condrócitos que são células responsáveis pela síntese da matriz extracelular que ocupa a maior parte da cartilagem articular, são originados de alguns tipos celulares dentre eles as células precursoras de condrócitos que se assemelham a fibroblastos e que sintetizam, da mesma maneira que esses últimos, colágeno do tipo I e III (NAUJOKS et al, 2008).

O disco articular em humanos é composto por fibrocatilagem e por esparsas células, como fibroblastos (mais numerosas), por fibrocondrócitos e por células semelhantes a condrócitos, sendo que nos pacientes adultos, apresenta-se avascular, tanto na porção central quanto na intermediária (YOSHIDA et al., 1997). Quando da presença de alterações no disco articular da ATM há uma aumento da densidade de vasos sanguíneos, especialmente na porção anterior do disco (DETAMORE et al., 2006). Sabe-se que apesar de fatores de crescimento, como VEGF, serem praticamente indetectáveis na cartilagem de ATM de adultos, existe um aumento progressivo quando da ocorrência de desarranjos no disco articular, sua regulação sendo realizada por diferentes fatores (citocinas e outros fatores de crescimento). Desta forma, existe uma relação direta entre a formação de novos vasos e a presença de níveis aumentados de VEGF (LEONARDI et al., 2003).

Paegle, Holmlund e Reinholt (2002) após realização do exame de autópsias de ATM de cadáveres de pacientes com desarranjo no disco articular e verificaram em seus resultados a presença de maior densidade de vasos na região posterior do ligamento do disco articular, assim como, de numerosos fibroblastos e de condrócitos, que segundo os autores, poderia refletir a tentativa de reparo motivado pela instalação de processo inflamatório.

2.5 TERAPIA COM FOTOBIOMODULAÇÃO LASER DE BAIXA POTÊNCIA (FLBP)

Laser é uma palavra de origem inglesa e vem da expressão *Light Amplification by Stimulated emission of Radiation* que traduzida significa amplificação de luz de emissão estimulada de radiação. É uma luz que difere das convencionais por apresentar características altamente específicas que são a base dos seus efeitos terapêuticos. Primeiramente, a luz laser possui coerência, ou seja, os raios apresentam a mesma direção e sentido, o que significa dizer que as energias emitidas por cada onda de luz são somadas, permitindo a emissão de altos níveis de energia. O feixe de laser também apresenta colimação, propriedade que resulta do fato das ondas serem emitidas de forma paralela com mínima divergência, o que resulta em mínima atenuação da luz durante o seu trajeto mesmo em relativas longas distâncias (SPIVAK et al., 1992; PINHEIRO, BRUGNERA, ZANIN, 2011). A outra propriedade atribuída ao laser é a monocromaticidade que faz com que o feixe de laser somente emita luz com um único comprimento de onda (DA SILVA et al., 2012).

O uso terapêutico do laser respeitando o limiar de sobrevivência celular para um determinado tecido, com a utilização de baixas intensidades de energia é denominado de terapia com Laser de baixa potência (FLBP). Nesse aspecto, utilizam-se porções do espectro eletromagnético vermelho visível e infravermelho (IV) de luz, que por sua vez, não são absorvidos por muitos componentes do organismo, tendo desta forma, um maior poder de penetração tecidual (GUERRA, 2009).

Vários autores atribuem ao comprimento de onda do laser a responsabilidade sobre o efeito terapêutico do mesmo (PINHEIRO et al., 1997; TUNÉR, HODE, 1998; OZDEMIR, BIRTANE, KOKINO, 2001; BJÖRDAL et al., 2003; PARKER, 2007; AHRARI, et al., 2013). Desta forma, a utilização inadequada do comprimento da luz laser poderá afetar a resposta ao tratamento, incluindo a manifestação de efeitos indesejáveis na laserterapia, comprometendo resultados do tratamento proposto (PINHEIRO et al., 2003).

Ressalta-se ainda que o comprimento de onda emitido pelo feixe de laser, bem como, a composição do tecido irradiado determinam o padrão de transferência de energia da luz laser para o tecido alvo, em decorrência disso o feixe do laser poderá ser parcial ou totalmente refletido ou transmitido através do tecido biológico irradiado (SPIVAK et al., 1992; BJÖRDAL et al., 2003). O poder de penetração do laser é determinado pelo seu comprimento de onda, obedecendo a uma razão diretamente proporcional, ou seja, quanto maiores forem as ondas emitidas maior será a penetração da luz no tecido irradiado (GUERRA, 2009).

Quanto ao poder de penetração atribuído à luz laser, Björdal et al. (2003) afirmaram que o laser IV tem o poder de penetração de cerca de 3 mm, enquanto o laser no espectro vermelho penetra somente 1 mm no tecido, afirmação corroborada por Pinheiro et al. (2003) e Maia et al., (2012). Lembrando que a ATM pode estar a 3 mm de profundidade a partir da superfície, a utilização do laser IV garantiria ação sobre esta articulação, mesmo considerando a perda de energia gerada pela barreira da pele que para os lasers IV de GaAlAs operando no modo contínuo é de cerca de 80%, comparado ao laser IV pulsado cuja perda de energia é relativamente menor (50%) (BJÖRDAL et al., 2003).

2.6 EFEITO ANALGÉSICO DA FOTOBIMODULAÇÃO COM LASER DE BAIXA POTÊNCIA

Várias pesquisas realizadas e seus resultados demonstram que o efeito terapêutico do laser é dose-dependente (BARBERIS et al., 2006; SIMUNOVIC, 1996; PINHEIRO et al., 1997; OZDEMIR, BIRTANE, KOKINO, 2001; TORRICELLI et al., 2001; PINHEIRO et al., 2003; AIMBIRE et al., 2006; NÚÑEZ et al., 2006). Simunovic (1996) enfatizaram que a utilização de sub-doses ou sobre-doses da irradiação laser poderiam resultar em nenhum efeito, efeito oposto, efeito negativo ou mesmo inibitório sobre o metabolismo celular. Outros autores corroboraram com a afirmativa, enfatizando que doses inadequadas, da mesma forma que acontece com o comprimento de onda, podem resultar em efeitos indesejáveis ao tecido irradiado (TORRICELLI et al., 2001; VENANCIO, CAMPARIS, LIZARELLI, 2005).

Considerando a importância da área de tecido a ser irradiada como determinante para a escolha da dose adequada do laser, Björdal et al. (2003) chama a atenção para o fato de que pelo tamanho reduzido da área sinovial referente à ATM, bastaria um simples ponto de aplicação a fim de ser entregue adequada dose ao local destinado à irradiação, o que não é verdadeiro para outras sinóvias de articulações maiores, como, por exemplo, do joelho que necessitariam de mais pontos de irradiação para garantir dose adequada (mínimo 3 pontos de

aplicação). Outros fatores também apresentam importância na efetividade da FLBP como, por exemplo: a condição imunológica do tecido e do próprio indivíduo que receberá a irradiação (TUNÉR, HODE, 1998).

A WALT (World Association of Laser Therapy) sugere que para a utilização terapêutica do LLLT na ATM de maneira eficiente, seja utilizado laser de arseneto de gálio e alumínio (GaAlAs) na faixa do infravermelho (IV), com comprimento de onda entre 780-860 nm e dose de 4 J/cm², irradiada em 1 ou 2 pontos, sendo realizadas 3 a 4 aplicações com intervalo de 48 horas entre essas. (CARVALHO et al., 2011).

A indicação terapêutica do FLBP no tratamento das DTM relaciona-se com algumas vantagens proporcionadas pela irradiação da ATM. Uma delas é o efeito analgésico resultante da irradiação com essa luz e confirmada por diferentes pesquisadores (SIMUNOVIC, 1996; PINHEIRO et al., 1997; PINHEIRO et al., 1998; TORRICELLI et al., 2001; BJÖRDAL et al., 2003; MIZUTANI et al., 2004; FERREIRA et al., 2005; KATO et al., 2006; NÚÑEZ et al., 2006; FIKÁCKOVÁ et al., 2007; MAZZETTO et al., 2007; CARVALHO et al., 2010; MAZZETTO, HOTTA, PIZZO, 2010; SANTOS et al., 2010; DA SILVA et al., 2012; DOSTALOVÁ et al., 2012; MAIA et al., 2012; SALMOS-BRITO et al., 2013).

O mecanismo de ação do laser sobre a sintomatologia dolorosa pode ser explicado de algumas maneiras, como, por exemplo: pela liberação de β-endorfinas no liquor espinhal, aumento do limiar de dor do paciente, através de um complexo mecanismo de bloqueio eletrolítico das fibras do nervo, redução da liberação de substâncias álgicas como a bradicinina e a histamina, aumento da produção de ATP, melhoria da microcirculação local e aumento do fluxo linfático, com resultante redução do edema presente (SIMUNOVIC, 1996; MAZZETTO et al., 2007; MAZZETTO, HOTTA, PIZZO, 2010).

Uma das explicações para a presença de dor nas DTM pode estar relacionada à presença de edema e reduzida microcirculação local, o que gera tensão no músculo. A sintomatologia dolorosa presente, por sua vez, gera mais tensão muscular, causando ainda maior aumento da dor local, o que incorre em um ciclo vicioso (SIMUNOVIC, 1996). A irradiação com FLBP estimularia o aumento da microcirculação na região afetada promovendo, por conseguinte, a redução da acidose local e, consequente, promoção da liberação e da remoção de substâncias relacionadas à dor (MIZUTANI et al., 2004; SANDOVAL et al., 2009).

Contestando os resultados positivos da FLBP sobre a microcirculação local Tullberg, Alstergren e Ernberg (2003) afirmaram, em seus resultados, que a FLBP não produziu aumento da microcirculação do músculo masseter de pacientes com dor orofacial crônica de

origem miofascial. Ressalta-se que nesse experimento, os autores somente realizaram uma única sessão de aplicação do laser sobre o músculo masseter, sugerindo a necessidade de várias aplicações para a obtenção de resultados positivos com a terapia com laser, como atestam outras pesquisas (PINHEIRO et al., 1997; MAZZETTO et al., 2007).

Ahrari et al., (2013) ressaltaram que a redução na sintomatologia dolorosa da ATM com a utilização da laserterapia é um ponto importante, pois permite que o profissional possa adotar uma abordagem melhor em relação ao tratamento dos fatores etiológicos associados à DTM, com maior conforto para o paciente. Dessa forma o FLBP é indicado como uma terapia alternativa aos tratamentos convencionais (MAZZETTO et al., 2007; MAZZETTO, HOTTA, PIZZO, 2010; AHRARAI et al., 2013), com a vantagem de não apresentar efeitos colaterais atestados, além de ser uma terapia não invasiva e de caráter reversível (SIMUNOVIC, 1996; BJÖRDAL et al., 2003; NÚÑEZ et al., 2006; ÇETINER et al., 2007; EMSHOFF et al., 2008; KUCUK et al., 2010; AHRARI et al., 2013).

As pesquisas ainda atestam outra vantagem da FLBP em relação ao controle da dor, trata-se do fato de que a diminuição da sintomatologia dolorosa obtida com o laser apresenta efeito acumulativo, que persiste mesmo quando finalizado o tratamento (SIMUNOVIC, 1996; PINHEIRO et al., 1997; PINHEIRO et al., 1998; KUCUK et al., 2010; AHARARI et al., 2013). O período de duração do efeito da FLBP não é exato, mas existem relatos atestando duração que pode variar de 3 semanas (BJÖRDAL et al., 2003) até 1 mês após finalizado o tratamento (AHARARI et al., 2013).

2.7 EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO A FOTOBIMODULAÇÃO COM LASER DE BAIXA POTÊNCIA

Björdal et al., (2003) e Zeredo et al., (2005) ressaltam que o efeito analgésico associado a FLBP está relacionado ao efeito anti-inflamatório da luz laser. Nesse ínterim, é importante frisar que a ação anti-inflamatória da FLBP foi comprovada por diversos autores, enfatizando a efetividade sobre a redução de mediadores inflamatórios, especialmente da PGE₂ (BARBERIS et al., 1995; BARBERIS et al., 1996; OZDEMIR, BIRTANE, KOKINO, 2001; MIZUTANI et al., 2004; PALLOTTA et al., 2012). Pallotta et al., (2012) ainda atestaram que a FLBP foi capaz de inibir todos os marcadores inflamatórios testados (IL1-β, IL6), bem como, inibiu a migração leucocitária, além da atividade da mieloperoxidase.

Sandoval et al., (2009) muito embora não tenham encontrado efeito positivo do laser sobre os sinais clínicos da infamação e no tecido sinovial proveniente da indução de joelhos

de coelhos, atribuem à terapia com laser um efeito modulatório sobre a inflamação, e sugerem que os resultados não satisfatórios obtidos na pesquisa em questão podem estar relacionados ao tempo insuficiente utilizado para a realização da irradiação tecidual (0,12 e 0,32 segundos), mesmo observado o protocolo que se utilizou de comprimento de onda de 830 nm, potência de 77mW e densidades de energia de 3,4 J/cm² e 8 J/cm² por ponto.

Carvalho et al., (2011) testaram o efeito do FLBP no controle da inflamação na ATM induzida por formalina, realizando para isso aplicações prévias à indução, bem como irradiações posteriores a injeção com o agente flogístico e encontraram, através da realização de análise histomorfológica, a ação anti-inflamatória do laser somente após o estabelecimento da inflamação, o que poderia ser explicado pelo fato de que a ação da laserterapia somente ocorre quando da presença de alterações na célula ou tecido (CARVALHO et al., 2011; PINHEIRO, BRUGNERA, ZANIN, 2010)

Muitas das vantagens atribuídas à FLBP relacionam-se com o efeito modulatório sobre o metabolismo celular, sendo a citocromo C oxidase, enzima terminal da cadeia respiratória mitocondrial, o fotoaceptor responsável pela supramencionada ação (KARU, KOLYAKOV, 2005; KARU et al., 2008; KARU, 2010a; KARU, 2010b). Esse fotorreceptor seria responsável pelo aumento da produção de ATP, que por sua vez, auxiliaria na mais rápida recuperação tecidual pós-irradiação (PARKER, 2007).

Karu (2010b) ressalta que a atividade da enzima citocromo c oxidase como fotorreceptor na laserterapia, seria atribuída aos componentes de valência mista do cobre da molécula da enzima que quando fotoexcitados estimulariam o metabolismo das células através de reações em cascata conhecida como sinalização celular; que pode ser iniciada por duas vias: uma delas é dependente do NO; a outra via teria relação com o ATP. Ressaltaram ainda que a produção de ATP pelo estímulo da luz laser tem uma grande importância pelo fato desta funcionar como molécula sinalizadora intercelular, auxiliando, não somente fornecendo energia, mas também promovendo a comunicação entre células e tecidos por todo o corpo, favorecendo o efeito da FLBP.

A faixa de irradiação necessária ao fotoestímulo da citocromo C oxidase estaria na região atribuída à fotobiomodulação, ou seja, na região do vermelho e próximo ao IV (KARU, KOLYAKOV, 2005; KARU et al., 2008; KARU, 2010b). Karu e Kolyakov (2005) demonstraram essa assertiva e afirmam que a faixa de comprimento de onda com potencial bioestimulador celular fica entre 660-860 nm, com diferentes picos de ação para diferentes espectros analisados. Já Benedicenti et al. (2008) encontraram aumento da produção de ATP

quando da utilização de laser com comprimento de onda de 904 nm, ativado no modo pulsado (Laser GaAs; potência 10mW; frequência 6kHz).

A irradiação com FLBP ainda estimula a produção de colágeno pela ação direta sobre os condrócitos (TORRICELLI et al., 2001; PINHEIRO et al., 2003; GUERRA, 2009) além de parecer estimular a interação entre os componentes da matriz extracelular importante no processo de reparo tecidual (KAMALI et al., 2007).

A despeito dos inúmeros trabalhos que atestam os efeitos positivos da utilização da FLBP quando na aplicação em desordens articulares e tecidos associados (SIMUNOVIC, 1996; PINHEIRO et al., 1997; PINHEIRO et al., 1998; OZDEMIR, BIRTANE, KOKINO, 2001; AMBIRE et al., 2006; KATO et al., 2006; NÚÑEZ et al., 2006; ÇETINER et al., 2007; FIKÁCKOVÁ et al., 2007; KAMALI et al., 2007; MAZZETTO et al., 2007; MAZZETTO, HOTTA, PIZZO, 2010; SANTOS et al., 2010; PALLOTTA et al., 2012) outros, no entanto, não encontraram o efeito desejado com a utilização dessa terapia (TULLBERG, ALSTERGREN, ERNBERG, 2003; VENANCIO, CAMPARIS, LIZARELLI, 2005; EMSHOFF et al., 2008; SANDOVAL et al., 2009; KUCUK et al., 2010). Quanto a essa controvérsia, Tunér e Hode (1998) chamam a atenção para o fato de que muitos trabalhos que afirmam a não eficiência da FLBP são pobramente estruturados e, portanto, deveriam ser considerados irrelevantes.

2.8 MODELOS EXPERIMENTAIS PARA AVALIAÇÃO DA DOR E INFLAMAÇÃO

Entende-se como nocicepção o potencial que um determinado estímulo tem de produzir lesão tecidual e a reação do organismo em decorrência do primeiro; enquanto estímulo algogênico é aquele capaz de produzir dor em se considerando o contexto: afetivo, motivacional e sensorial (LE BARS, GOZARIU, CADDEN, 2001).

O estudo sobre os mecanismos da dor e analgesia inferem a necessidade da criação de modelos, que se valem normalmente da utilização de animais experimentais que, por conseguinte, necessitam serem estimulados adequadamente de maneira que a sensação seja provocada e que as respostas possam ser ao mesmo tempo reproduzíveis, quantificáveis e não-invasivas (DUBUSSON, DENNIS, 1977; LE BARS, GOZARIU, CADDEN, 2001).

Dentre as formas para avaliar dor, os estudos utilizando animais conscientes, designados como “estudos comportamentais” parecem oferecer adequados resultados, uma vez que as respostas ao estímulo poderão ser quantificadas diretamente através das reações

padronizadas como parte do repertório comportamental próprio de cada espécie animal (LE BARS, GOZARIU, CADDEN, 2001; CAPRA, RO, 2004).

Os estímulos utilizados nos estudos mencionados podem ser de origem variada, incluindo os de natureza térmica, mecânica, elétrica e química (LE BARS, GOZARIU, CADDEN, 2001). À exceção dos testes utilizando substâncias químicas, as demais formas de estímulos produzem dor transitória, que se caracteriza por ser de curta duração (dor fásica). Contudo, ressalta-se que a maioria da sintomatologia dolorosa verificada é, portanto, razão de reclamações dos indivíduos, é de dor contínua e, usualmente, de origem patológica (DUBUSSON, DENNIS, 1977). Nesse contexto, a utilização de agentes químicos para a estimulação da dor é uma opção importante, uma vez que, induzem respostas progressivas, bem como de longa duração com distinguíveis comportamentos verificados assim que o agente é aplicado, e que podem ser mensurados por unidade de tempo. Os modelos experimentais que envolvem a administração e agentes químicos intraperitoneais ou intradérmicos são os que mais se aproximam da natureza clínica da dor (LE BARS, GOZARIU, CADDEN, 2001; RABOISSON, DALLEL, 2004).

Contudo, Nicoll et al. (2010) desenvolveram um modelo experimental de dor na ATM, sendo o primeiro modelo a demonstrar hipersensibilidade comportamental induzida mecanicamente, utilizando-se da aplicação de um protocolo de carga mecânica não invasiva sobre a mandíbula de ratos (2 N de força; 1 hora/dia durante sete dias) e que produziu por conseguinte, a instalação de osteoartrite nessa articulação que pode ser verificada histologicamente auxiliando na compreensão das características da inflamação produzida no tecido. A dor verificada nesse modelo apresentou, ainda, características de persistência, mesmo após removido o estímulo, em período de tempo superior aos obtidos nos modelos clássicos comportamentais pela injeção de substâncias químicas.

Pode-se ressaltar outra vantagem na utilização do estímulo químico, o fato de necessitar de mínima ou nenhuma forma de contenção do animal, reduzindo o estresse que poderia, por sua vez, interferir na resposta obtida, potencializando a dor (HILL, BELLEVILLE, WIKLER, 1955; DUBUSSON, DENNIS, 1977; SCHUMACHER, VELDEN, 1984; CLAVELOU et al., 1989).

Várias são as substâncias utilizadas como estímulo para produção de sintomatologia dolorosa, com resultante promoção de um modelo de dor tônica. As principais substâncias utilizadas têm a ação duradoura, mas não podem ser consideradas modelos de dor crônica, uma vez, que a resposta produzida não dura mais que dezenas de minutos, dentre as quais podem ser citadas: a formalina, a capsaicina, o óleo de mostarda. Por outro lado, os testes

comportamentais que se utilizam da administração intracapsular de substâncias específicas, como a carragenina, o Adjuvante Completo de Freund e os cristais de uretano são relacionados a modelos de dor crônica (LE BARS, GOZARIU, CADDEN, 2001).

A dor advinda da maioria das substâncias químicas utilizadas em testes comportamentais foi referendada em modelo de nocicepção em tecidos cutâneos, mas não permitiam o estudo dos mecanismos envolvidos em condições de dor craniofascial profunda (CLAVELOU et al., 1989; CLAVELOU et al, 1995). Contudo, Roveroni et al., (2001) utilizaram a formalina em tecido profundo da ATM de ratos, e afirmaram que a injeção com formalina nessas condições produziu comportamento nociceptivo quantificável, constituindo um novo modelo comportamental de dor na ATM.

É fato inconteste que a produção de dor pelas substâncias químicas é dose-dependente, fazendo-se crer que a injeção de quantidade adequada do agente algésico é fator de suma importância para a obtenção dos comportamentos a serem mensurados (CLAVELOU et al., 1995; ROVERONI et al., 2001; RABOISSON, DALLEL, 2004; BONJARDIM et al., 2008).

Dentre as substâncias disponíveis para a utilização em modelos experimentais utilizando animais, a formalina e a carragenina são de longe as mais utilizadas. A primeira garante a quantificação de dor aguda de longa duração em testes de nocicepção (CLAVELOU et al., 1989; ROSLAND et al., 1990; CLAVELOU et al., 1995, ROVERONI et al., 2001; RABOISSON, DALLEL, 2004). A segunda é frequentemente usada para indução de inflamação experimental e de dor inflamatória (PETER-SZABO et al., 2007), especialmente, para avaliação de drogas com indicação para tratamentos anti-inflamatórios (GOULART et al, 2005). Peter-Szabo et al., (2007) tenham proposto a utilização da carragenina para modelo sub-crônico de dor articular aguda em ratos, sugerindo com base em seus resultados, que a repetida administração de carragenina foi útil em determinar o efeito da utilização de tratamentos por longo período de tempo.

2.9 FORMALINA

Dentre os agentes químicos disponíveis para os modelos de nocicepção, a injeção com formalina, aparece como um dos mais utilizados para a promoção de dor em roedores (CLALELOU et al., 1995; CHICHORRO, LORENZETTI, ZAMPRONIO, 2004), tendo sido inicialmente descrito por Dubuisson e Dennis (1977), quando injetaram formalina a 5% na região intraplantar em patas de ratos e gatos objetivando a verificação de respostas

comportamentais por intermédio de escores, bem como, o efeito analgésico da morfina, de meperidina e da estimulação elétrica em relação à indução realizada.

Em período posterior, Clavelou et al. (1989) propuseram uma adaptação ao teste original de formalina para aplicação em tecidos superficiais da região orofacial e, desta forma, realizaram a injeção da substância em diferentes concentrações no lábio superior de ratos, obtendo de mesma maneira resposta comportamental relacionada, e tendo ao final a configuração de um modelo de nocicepção confiável e válido (CLAVELOU et al., 1989; CLAVELOU et al., 1995, DALLE et al., 1995; ROVERONI et al., 2001; RABOISSON, DALLEL, 2004), contudo, falho na tentativa de estudar os mecanismos envolvidos em condições de dor craniofacial profunda, como verificado nas condições dolorosas da ATM (ROVERONI et al., 2001). Por isso, em 2001, Roveroni et al. desenvolveram um modelo comportamental de dor na ATM com a injeção de formalina em diferentes concentrações, verificando ser um modelo confiável de quantificação de dor na ATM, bem como, do efeito de drogas com ação analgésicas sobre essa articulação.

Caracteristicamente, a indução com formalina gera uma dor de origem neurogênica fruto de um estímulo nocivo sustentado e difuso (ZEREDO et al., 2005). De maneira geral, a dor produzida pela injeção com formalina é inferida através da verificação de comportamentos bem definidos e constantemente exibidos, com o animal em vigília, retratando ao máximo os aspectos clínicos da dor; além do fato dos comportamentos observados poderem ser convertidos em valores numéricos, ou seja, são quantificáveis. Soma-se a isto, o fato da injeção de formalina produzir sensação dolorosa contínua e duradoura, o que favorece a utilização em avaliações com necessidade de longo período de observação (DUBUSSON, DENNIS, 1977).

A indução nociceptiva com formalina, independente do sítio de aplicação, exibe um modelo bifásico de dor que tem início logo após a injeção no tecido. As duas fases apresentam características e origens distintas. A primeira fase (inicial) dura de 0 a 5 minutos e tem resposta atribuída a ação direta do irritante químico aos nociceptores periféricos (DUBUSSON, DENNIS, 1977; ROSLAND et al., 1990; ABBOTT, FRANKLIN, WESTBROOK, 1995; ROVERONI et al., 2001, ZEREDO et al., 2005; MIRANDA, SIERRALTA, PRIETO, 2009). Após esse período segue-se uma fase de aquiescência (09 a 15 minutos), representada por relativa redução das respostas comportamentais. A última fase (tardia) tem duração de 20 a 30 minutos, sendo a mais intensa em termos de manifestações, sendo atribuída à reação inflamatória periférica e sensibilização da medula espinhal

(ROSLAND et al., 1990; ABBOTT, FRANKLIN, WESTBROOK, 1995; ROVERONI et al., 2001, ZEREDO et al., 2005; MIRANDA, SIERRALTA, PRIETO, 2009).

Tjølsen et al., (1992) relataram em seus trabalhos que a bradicinina, bem como, a substância P participam diretamente da primeira fase da indução nociceptiva com formalina. Já em relação à segunda fase da indução, citam-se como mediadores envolvidos: a histamina, a serotonina, prostaglandinas e a já citada bradicinina, todos, potentes indutores de dor.

Os comportamentos verificados em decorrência da indução nociceptiva com formalina diferem substancialmente daqueles verificados nos animais em condições normais (não induzidos). É fato de que a injeção de formalina em diferentes concentrações na ATM de ratos conduz a comportamentos de levantar rapidamente a cabeça, tombar a cabeça para o lado injetado (ROVERONI et al., 2001) que não são observados quando da injeção com este agente irritante no lábio superior (CLAVELOU et al., 1995).

Outro comportamento também é marcadamente observado na injeção com formalina na ATM. Trata-se do ato de coçar a região injetada com o algógeno. Deve-se lembrar que esse comportamento faz parte do elenco de comportamentos habituais do animal. O rato frequentemente, coça a face para a realização de termo regulação, para a melhor distribuição de feromônios (sinalização social), além dos cuidados naturais com a pelagem, que acontecem de maneira organizada e bilateral, ao contrário do comportamento mediado por sintomatologia dolorosa da ATM e de regiões da face outras, que ocorrem de forma direcionada ao local da dor (ABBOTT, FRANKLIN, WESTBROOK, 1995; VOS, HANS, ADRIAENSEN, 1998; ROVERONI et al., 2001).

Os comportamentos observados ora são mensurados individualmente, ora em conjunto. Muito embora a avaliação dos comportamentos de maneira separada possa auxiliar no estudo de diferentes componentes da dor (BONJARDIM et al., 2008), essa forma mostra uma grande variabilidade nos resultados, especialmente levando-se em consideração que o ato de coçar a face e levantar a cabeça demonstram um padrão alternado de aparecimento, ou seja, quando um aparece com maior intensidade o outro exibe-se menos intenso e vice-versa. Ao contrário, quando se avalia a soma dos comportamentos têm-se uma ideia global da manifestação de dor experimentada pelo animal; logo, pode-se inferir que combinações de vários comportamentos desenvolvem uma melhor e mais confiável medida de intensidade de dor do que o comportamento simples (ABBOTT, FRANKLIN, WESTBROOK, 1995; ROVERONI et al., 2001; BONJARDIM et al., 2008).

Ressalta-se ainda que os comportamentos verificados em decorrência da indução com formalina na ATM são dose-dependente. Rosland et al. (1990) afirmaram que doses muito

baixas de formalina (0,02-0,2%), somente induzem a primeira fase da resposta nociceptiva, enquanto, doses com concentrações a partir de 1% ou superior induzem ambas as fases da resposta comportamental.

Os comportamentos ainda sofrem interferência de uma série de variáveis, incluindo: sexo, espécie, temperatura do ambiente, estresse ambiental (sons, luz brilhante, movimentos de humanos no local de realização dos testes, odores presentes) que podem afetar os resultados da avaliação (TJØLSEN et al., 1992; BONJARDIM et al, 2008), e por isso devem ser controlados ao máximo.

2.10 CARRAGENINA

A carragenina configura-se como um dos mais utilizados agentes algogênicos para avaliação da ação de drogas anti-inflamatórias (MAZZARI et al., 1996; MISIEWICZ et al., 1996; GUALILLO et al., 2000; GOULART et al., 2005; SULEYMAN et al, 2006). É principalmente derivada da alga *Chondrus crispus* de origem Irlandesa, podendo, no entanto ser extraída de outras algas de estrutura semelhante (DI ROSA, 1972; STRINGER, BOSE, McCORD, 1997). Mais tarde (1945), foi proposto por Tjeng que a denominação “CARRAGENINA” seria restrita ao polissacarídeo extraído exclusivamente das algas: *Chondrus crispus*, assim como, da *Gigartina stellata* (DI ROSA, 1972).

Quimicamente, a carragenina é representada por duas frações distintas a partir de uma estrutura polissacarídica sulfatada, a saber: uma fração sensível ao íon potássio denominada κ -carragenina e outra insensível ao mesmo íon, denominada λ -carragenina, sendo a última apresentando maior capacidade de induzir resposta inflamatória aguda ou crônica, além de ser mais tóxica (DI ROSA, 1972).

A injeção com carragenina na pata de rato para a produção de edema foi primeiramente realizada no início da década de 60 por Winter, Risley e Nuss (1962), os mesmos que, com o auxílio do modelo de inflamação com carragenina da pata de ratos, avaliaram o efeito anti-inflamatório da indometacina (CARVALHO, 2011).

No trabalho de Goulart et al. (2005) o edema, bem como, exsudato fibrino-hemorrágico e moderado infiltrado neutrofílico puderam ser observados cerca de 03 horas após a indução com carragenina na ATM de ratos; tendo um agravamento do quadro inflamatório em 24 horas a partir da indução além da presença de edema. Os autores chamaram a atenção para o fato de que o quadro inflamatório persistiu até 07 dias tendendo a

características de infiltrado crônico, sendo que em comparação com a formalina, a carragenina mostrou uma inflamação menos persistente em função do tempo.

O mecanismo inflamatório e hiperalgésico relacionados à carragenina inclui a liberação inicial de bradicinina com subsequente liberação de cascata de citocinas pró-inflamatórias, incluindo: TNF- α e IL1- β , além de prostaglandina e aminas simpáticas, com consequente, formação de edema mediada pelas prostaglandinas e a migração leucocitária com participação crucial das citocinas (CUNHA et al., 2008). Capra e Ro (2004) ressaltaram que a utilização de substâncias exógenas para indução inflamatória, como a carragenina, permite o desenvolvimento de modelos para estudo de respostas neurais e comportamentais para tratamentos que necessitem de avaliações de longa duração.

A carragenina também pode ser utilizada para desenvolver modelo de dor crônica. Peter-Szabo et al., (2007) realizaram um experimento onde injetaram repetidas vezes carragenina no tornozelo de ratos, desenvolvendo um modelo subcrônico de dor e verificaram que a utilização do agente flogístico nessas condições resultou na formação de edema e de dor de forma persistente, que não normalizaram após três dias. Com bases na metodologia utilizada e nos resultados obtidos, os autores concluíram que aplicações repetidas com carragenina poderiam ser consideradas como um modelo apropriado para avaliações de tratamentos de longa duração.

2.11 UTILIZAÇÃO DA FOTOBIOMODULAÇÃO COM LASER DE BAIXA POTÊNCIA (FLBP) EM MODELOS EXPERIMENTAIS PARA AVALIAÇÃO DA DOR E INFLAMAÇÃO

A utilização da FLBP para o tratamento anti-inflamatório e analgésico tem recebido especial atenção dos pesquisadores, sugerindo a realização de vários estudos *in vitro*, objetivando a análise do seu mecanismo de ação. Contudo, ainda são poucos os trabalhos dessa natureza referendados na literatura abordando sobre a ação específica da FLBP na ATM. Sendo assim, a compreensão dos resultados benéficos sobre a inflamação e dor nessa articulação têm se fundamentado, em sua maioria, em estudos clínicos (SIMUNOVIC, 1996; PINHEIROS et al., 1997; PINHEIROS et al., 1998; VENANCIO, CAMPARIS, LIZARELLI, 2005; KATO et al., 2006; NÜNEZ et al., 2006; ÇETINER, KAHRAMAN, YÜCETAS, 2007; FIKÁCKOVÁ et al., 2007; MAZZETTO et al., 2007; EMSHOFF et al., 2008; CARVALHO et al., 2010; MAZZETTO, HOTTA, PIZZO, 2010; DA SILVA et al., 2012; DOSTALOVÁ et al., 2012; AHRARI et al., 2013) ou em inferências a partir dos resultados

observados em outras articulações ou tecidos (BARBERIS et al., 1995; BARBERIS et al., 1996; TORRICELLI et al., 2001; PINHEIRO et al., 2003; FERREIRA et al., 2005; ZEREDO et al., 2005; AIMBIRE et al., 2006; KAMALI et al., 2007; GUERRA, 2009; SANDOVAL et al., 2009; DE BEM et al., 2010; PALLOTTA et al., 2012).

Deve-se enfatizar que a ATM é uma articulação diferenciada e complexa que apresenta características que diferem das outras articulações de mesma classificação (TOMINAGA et al., 2001). Diante disto, os resultados obtidos devem caracterizar os aspectos de relevância dessa articulação de modo a que a avaliação do tratamento possa ser bem fundamentada em seus resultados (DA SILVA et al., 2012).

Embora já tenha sido confirmada semelhanças histológicas e morfológicas da ATM de ratos e de seres humanos, até o presente momento, somente o trabalho de Carvalho et al, (2011) utilizou-se da avaliação e caracterização histomorfológica para verificação do efeito anti-inflamatório da FLBP. Associada às outras vantagens da utilização deste espécime em modelos experimentais, quais sejam: ser de fácil manuseio, além de ter um custo reduzido para manutenção nos biotérios (PORTO et al., 2010).

A avaliação do efeito analgésico do laser sobre a DTM também tem sido pouco explorado, sendo que os modelos de nocicepção utilizados para avaliação do efeito da FT na região orofacial têm-se valido da aplicação do agente algésico na região do peri oral (ZEREDO et al., 2005), respeitando o modelo inicialmente proposto por Clavelou et al., (1989). Até o presente momento não existem relatos na literatura utilizando-se do modelo proposto por Roveroni et al, (2001) com a aplicação do agente algógeno diretamente na articulação com posterior avaliação comportamental para verificação do efeito da FLBP.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAL

Avaliar o efeito da fotobiomodulação a laser de baixa potência (FLBP) sobre a nocicepção induzida com formalina, bem como, sobre o processo inflamatório induzido com carragenina, ambos realizadas na ATM em ratos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito antinociceptivo imediato de três diferentes protocolos de FLBP na nocicepção induzida por formalina na ATM;
- Comparar o efeito antinociceptivo dos três protocolos de FLBP avaliados em relação ao tratamento convencional com uma droga anti-inflamatória não-esteroidal (AINES);
- Avaliar o efeito anti-inflamatório do FLBP na inflamação induzida por carragenina na ATM de ratos por meio da descrição dos achados histomorfológicos;
- Analisar a associação entre atividade antinociceptiva e anti-inflamatória da FLBP sobre a inflamação induzida na ATM de roedores;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1-AVALIAÇÃO DA RESPOSTA ANTINOCICEPTIVA

4.1.1 Submissão ao Comitê de Ética e Pesquisa

O projeto da pesquisa foi elaborado e encaminhado ao Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Tiradentes para submissão ao crivo dos componentes do mesmo, com a finalidade de obter a aprovação para o início dos trabalhos, tendo sido aprovado por intermédio da obtenção de parecer emitido pelo comitê com o registro nº **030609** (ANEXO A).

4.1.2 Seleção dos espécimes amostrais

Para a realização dessa etapa da pesquisa foram utilizados, 25 ratos machos da raça *Rattus Novergicus albinus* da linhagem Wistar com peso equivalente a 300 ± 50 g, originados do Biotério da Universidade Tiradentes.

Os animais ficaram alojados em gaiolas plásticas (05 espécimes por gaiola), sob ciclo de claro e escuro (12/12 horas), no período anterior a etapa experimental propriamente dita, com o cílico de luz iniciado a partir das 9:00 horas da manhã. A dieta alimentar, *padrão Labina®* e a água foram servidos *ad libitum*. Todos os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada em 23° C.

4.1.3 Procedimentos gerais

Toda a fase experimental foi realizada no ciclo de luz, entre 9:00 e 17:00 horas, em um ambiente mantido em silêncio e em temperatura controlada (23° C), de acordo com Rosland (1991). Durante os 7 dias anteriores à realização do experimento, os animais foram manipulados a fim de se habituarem às etapas experimentais. No dia do experimento propriamente dito, os animais foram colocados durante 15 minutos em uma câmara teste (30x30x30cm) confeccionada com base de madeira, tendo 03 laterais espelhadas e um dos lados em vidro (Figura 1), com a finalidade de minimizar o estresse resultante da ambientação do animal (ABBOTT, FRANKLIN, CONEL, 1986). Após este tempo, o animal foi removido da câmara para proceder à realização da anestesia.



Figura 1. Imagem mostrando a caixa utilizada para a realização das avaliações das respostas nociceptivas. Diâmetro da caixa 30x30x30 cm, sendo três paredes laterais e o piso da caixa todos recobertos por espelhos e um dos lados com vidro removível para permitir a observação do animal.

4.1.4 Preparação dos animais para a indução com formalina

Imediatamente anterior ao período de indução álgica com formalina, o animal foi levemente anestesiado por inalação com halotano (Tanohalo-Cristália: Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itabira-SP-Brasil), a fim de serem executados a indução da nocicepção com formalina e os tratamentos de acordo com o grupo avaliado.

4.1.5 Indução da nocicepção com formalina

A indução da nocicepção na ATM dos animais foi realizada com formalina a 2,5%, obtida a partir da diluição de formol a 37% em água destilada, em volume estabelecido. A injeção com a formalina foi realizada na ATM direita do animal experimental com o auxílio de uma seringa para insulina (BD Ultra-Fine- agulha 12,7 mm de comprimento e 0,33 mm de calibre, Becton Dickinson, Juiz de Fora-MG-Brasil), cuja ponta da agulha foi introduzida na região imediatamente inferior ao processo zigomático do osso temporal, sendo em seguida movimentada mesio-anteriormente em direção ao espaço articular onde 50 μ L da substância

álgica foram injetadas lentamente. Finalizada a indução o animal retornou à câmara de observação, a fim de iniciar a verificação das respostas comportamentais nociceptivas. Ressalta-se que cada animal selecionado para a avaliação nociceptiva, somente foi manipulados uma única vez.

4.1.6 Tratamentos e procedimentos realizados

Os 25 animais selecionados para o trabalho foram divididos em 05 grupos (n=5) de acordo com o tipo de procedimento aos quais seriam submetidos (Tabela 1). No grupo CRG (Grupo Controle Negativo), os ratos receberam somente a injeção de formalina a 2,5% na articulação direita. No grupo DFN, os animais foram pré-tratados com diclofenaco sódico – 10 mg/kg/i.p. (Voltaren® 75 mg/3mL-Solução Injetável- Novartis Biociências S.A., São Paulo-SP-Brasil) a injeção i.p 10 mg/kg de peso de diclofenaco sódico (Voltaren® 75 mg/3mL-Solução Injetável- Novartis Biociências S.A., São Paulo-SP-Brasil), 1 hora antes da administração do agente álgico na ATM dos ratos (PADI, NAIDU, KULKARNI, 2006), como descrito anteriormente.

Os animais dos grupos LST1, LST2 e LST3 foram submetidos ao tratamento com fotobiomodulação à Laser na porção central da ATM direita, de acordo com o seguinte protocolo: Laser diodo semi-condutores GaAlAs¹, (Twin Laser-MMOptics®- São Carlos-SP-Brasil- Figura 2), no espectro eletromagnético Infravermelho (IV) e área do spot (0,04 cm²). A fluência variou em 12,5 J/cm², 52,5 J/cm² e 87,5 J/cm², assim como a potência do aparelho utilizado, variou entre: 50 mW, 70 mW e 70 mW, e os tempos utilizados para aplicação do Laser foram, respectivamente: 10, 30 e 50 segundos, de acordo com o subgrupo analisado conforme demonstrado no quadro abaixo. Ressalta-se que as aplicações com FLBP, levando-se em consideração os três protocolos utilizados, foram realizadas, imediatamente, após a indução inflamatória com a formalina a 2,5%, tal qual descrita no item anterior (4.1.5). Os parâmetros da FLBP estão especificados na tabela 2.

O pré-tratamento com injeção intraperitoneal com solução salina a 0,9%, assim como, a irradiação com laser na fluência de 0,0 J/cm² foram realizadas em todos os animais experimentais, a fim de garantir que os mesmos fossem submetidos às mesmas condições de estresse eliminando, dessa forma, possíveis vieses (Tabela 1).

¹ GaAlAs – relativos aos meios semicondutores Gálio, Alumínio e Arseneto.



Figura 2: Aparelho Laser diodo semi-condutores GaAlAs², (Twin Laser-MMOptics® - São Carlos-SP-Brasil)

Tabela 1: Distribuição dos animais experimentais de acordo com o tipo de tratamento preconizado para a realização da avaliação antinociceptiva.

Grupos (N=25)	INDUÇÃO INFLAMATÓRIA	TRATAMENTO
CRG	Formalina a 2,5%	Laser na fluência de 0,0 J/cm ² Injeção intraperitoneal de 0,2mL de solução salina a 0,9%
DFN	Formalina a 2,5%	Laser na fluência de 0,0 J/cm ² 10 mg/kg de peso de Diclofenaco sódico (i.p.)
LST1	Formalina a 2,5%	Laser na fluência de 12,5 J/cm ² Injeção intraperitoneal de 0,2mL de solução salina a 0,9%
LST2	Formalina a 2,5%	Laser na fluência de 52,5 J/cm ² Injeção intraperitoneal de 0,2mL de solução salina a 0,9%
LST3	Formalina a 2,5%	Laser na fluência de 87,5 J/cm ² Injeção intraperitoneal de 0,2mL de solução salina a 0,9%

² GaAlAs – relativos aos meios semicondutores Gálio, Alumínio e Arseneto.

Table 2. Descrição dos parâmetros da FLBP aplicados aos grupos irradiados.

Parâmetros	Dados da FLBP		
	LST1	LST2	LST3
Emissão	Modo contínuo	Modo contínuo	Modo contínuo
Comprimento de onda	780 ± 10 nm	780 ± 10 nm	780 ± 10 nm
Meio ativo de emissão de luz	GaAlAs	GaAlAs	GaAlAs
Potência (<i>input</i>)	50 mW	70 mW	70 mW
Energia total	0,5 J	2,1 J	3,5 J
Área de spot	0,04 cm ²	0,04 cm ²	0,04 cm ²
Densidade de potência	1,25 W/cm ²	1,75 W/cm ²	1,75 W/cm ²
Densidade de energia	12,5 J/cm ²	52,5 J/cm ²	87,5 J/cm ²
Tempo de irradiação	10 s	30 s	50 s
Divergência do feixe perpendicular à junção	17°	17°	17°
Ângulo da ponta	50°	50°	50°

4.1.7 Avaliação da resposta antinociceptiva

Logo após a indução com a formalina e a recolocação do animal na câmara de observação iniciou-se a avaliação das respostas comportamentais nociceptivas que foram caracterizadas pela soma do período de tempo que os animais apresentaram o comportamento de coçar a região orofacial (CO), com o número de vezes que os animais levantaram rapidamente a cabeça (LC) ao longo do período de observação. Para a soma dos comportamentos, foi determinado que cada ato de levantar rapidamente a cabeça (LC) corresponderia a 1 segundo (ROVERONI et al., 2001). As mensurações foram feitas com o auxílio de um cronômetro (UNILAB-São Paulo-SP-Brasil) e um contador de células (Hand Tally Counter-Taiwan-república da China), respectivamente, por um período total de 45 minutos que foram divididos em 15 blocos de 3 minutos cada (ROVERONI, et al., 2001).

Ressalte-se que as análises comportamentais foram realizadas por um pesquisador que não teve conhecimento dos tratamentos que foram instituídos (estudo encoberto).

Como procedimento de rotina, o sítio de aplicação da formalina foi confirmado pós-*mortem* através do indicador de edema, caracterizado pelo extravasamento plasmático do corante Azul de Evans (1%), administrado endovenosamente (0,4 mL), sob anestesia com 10 mg/Kg de peso de hidrocloreto de xilazina (Anasedan injetável- CEVA Sante Animale, Paulínia-SP, Brasil) e 25 mg/Kg de peso de cloridrato de ketamina (Dopalen injetável-CEVA

Sante Animale, Paulínia-SP, Brasil), 10 minutos antes do animal ter sido sacrificado e perfundido com solução salina. Tendo em vista que o corante Azul de Evans se liga às proteínas plasmáticas (HAAS, et al., 1992), o local da aplicação da injeção pode ser identificado visualmente e registrado com câmara fotográfica digital (Sony modelo Cyber-Shot, 10,1 megapixels- Sony Brasil Ltda, São Paulo-SP-Brasil).

Segue a descrição da administração do corante Azul de Evans:

- Iniciou-se pelo preparo da solução de Azul de Evans (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), equivalente a 20mg/Kg de peso do animal. O preparo desta forma foi realizado misturando-se 20 mg do corante Azul de Evans com 1mL de solução salina a 0,45%, (50% de soro fisiológico/50% de água destilada). A mistura foi agitada repetidas vezes, a fim de garantir uma mistura homogênea;
- Finalizada a avaliação comportamental, o animal foi anestesiado com injeção intraperitoneal de 10mg/kg de peso de hidrocloreto de xilazina e 25 mg/kg de peso de cloridrato de quetamina, como descrito anteriormente.
- Em seguida, o animal foi colocado em um aparato cirúrgico em decúbito dorsal, com a cabeça e membros fixados, de maneira a coibir a movimentação de ambos.
- Seguiu-se pela injeção por via peniana do corante anteriormente preparado com o auxílio de uma seringa de insulina de 100 U (BD Ultra-Fine- agulha 08mm de comprimento e 0,3 mm de calibre, Becton Dickinson, Juiz de Fora-MG-Brasil). A quantidade de corante injetado equivaleu a 1 mL/Kg peso do animal. Após o corante ter sido corretamente injetado puderam-se observar as extremidades do corpo do animal ficarem com a coloração azulada, confirmando a correta técnica de injeção do corante.

Finalizada a etapa de injeção com corante Azul de Evans, foi realizada a perfusão cardíaca. Para tanto, ainda com o animal sob sedação, foi realizada uma pequena incisão na região abdominal, com o auxílio de uma lâmina de bisturi nº 15 (Medblade- Med Goldman Indústria e Comércio Ltda, Manaus-AM-Brasil) presa ao cabo de bisturi nº 03 (Golgran Ind. Com. Instr. Ltda, São Paulo-SP-Brasil), que funcionou como um acesso para divulsionar e seccionar os tecidos, cuidadosamente, a fim de expor o coração, sendo esse procedimento realizado com o auxílio de tesouras Metzembbaum retas (Golgran Ind. Com. Instr. Ltda, São Paulo-SP-Brasil) e pinça clínica (Golgran Ind. Com. Instr. Ltda, São Paulo-SP-Brasil). O passo seguinte foi a perfusão do coração, propriamente dita, feita com o auxílio de um cateter para infusão intravenosa 23G (Lamedid-Lamedid Comercial e Serviços Ltda, Baueri-SP-

Brasil) com agulha de grosso calibre acoplada (agulha 18G x 1 1/2"-BD, Becton Dickinson, Juiz de Fora-MG-Brasil) introduzida na aurícula esquerda com liberação da solução salina (Solução de Cloreto de Sódio a 0,9%-Ecoflac Plus-Laboratórios B Braun S.A., São Gonçalo-RJ-Brasil), sendo esta injetada via ventrículo direito, por onde foi drenado todo o sangue.

O próximo passo foi a remoção da cabeça do animal que já havia sido eutanasiado pela ação da perfusão sanguínea. Os tecidos foram removidos com o auxílio da lâmina de bisturi nº 15 (Medblade- Med Goldman Idústria e Comércio LTDA, Manaus-AM-Brasil) presa ao cabo nº 03 (Golgran Ind. Com. Instr. Ltda, São Paulo-SP-Brasil), a fim de expor a articulação temporomandibular e verificar a presença do corante Azul de Evans (Figura 3) confirmando, desta forma, a infiltração adequada da formalina na região da ATM, objetivando a indução álgica.

Os dados sobre os acompanhamentos de cada etapa foram registrados em ficha elaborada para este fim. (APÊNDICE A)

4.2-AVALIAÇÃO HISTOMORFOLÓGICA

4.2.1 Seleção dos espécimes amostrais

Para essa etapa da pesquisa foram utilizados, 45 ratos machos da raça *Rattus Novergicus albinus* da linhagem Wistar com peso equivalente a 300 ± 50 g, originados do Biotério da Universidade Tiradentes/SE.

Os animais foram alojados em gaiolas plásticas (05 espécimes por gaiola), sob ciclo de claro e escuro (12/12horas), no período anterior a etapa experimental propriamente dita, com o clico de luz iniciado a partir das 6:00 horas da manhã. A dieta alimentar, *padrão Labina®* e a água foram servidos *ad libitum*. Todos os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada em $23^\circ\pm2^\circ\text{C}$.

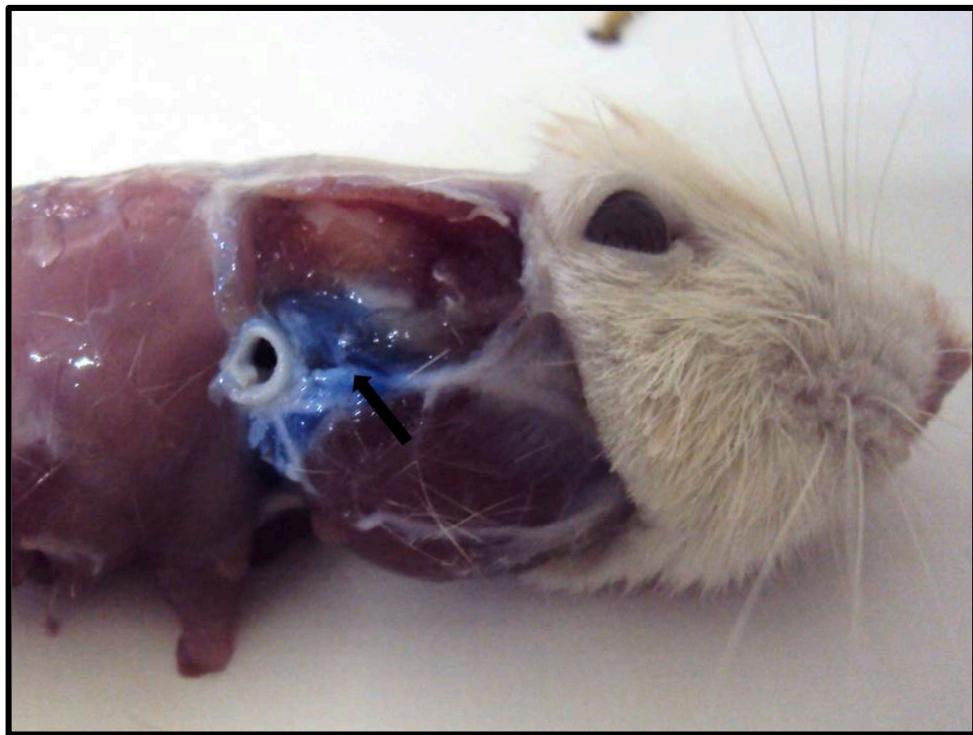


Figura 3. Imagem mostrando a presença do corante azul de Evans confirmando a indução com a formalina na área da ATM.

4.2.2 Procedimentos gerais

Toda a fase experimental foi realizada no ciclo de luz, entre 9:00 e 17:00 horas, em um ambiente mantido em silêncio e em temperatura controlada ($23^{\circ}\pm2^{\circ}\text{C}$), de acordo com Rosland (1990). Durante os 7 dias anteriores à realização do experimento, os animais foram manipulados a fim de se habituarem às etapas experimentais. No dia do experimento propriamente dito, os animais foram colocados no ambiente onde seriam realizados os experimentos a fim de se ambientarem, com a finalidade de minimizar o estresse resultante da ambientação do animal (ABBOTT, FRANKLIN, CONEL, 1986), como informado anteriormente. Após este tempo, cada animal a seu tempo foi removido da gaiola a fim de proceder à anestesia.

4.2.3 Anestesia dos animais experimentais

Os animais experimentais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de 10mg/kg de peso de hidrocloreto de xilazina (Anasedan injetável- CEVA Sante Animale, Paulínia-SP, Brasil) e 25 mg/kg de peso de cloridrato de quetamina (Dopalen injetável-CEVA Sante Animale, Paulínia-SP, Brasil) A dosagem administrada foi relacionada ao peso do animal e correspondendo à relação de 0,1 mL da substância anestésica para cada 100 g de peso do

animal. Para isso cada animal foi pesado em balança calibrada, anteriormente a aplicação da anestesia, sendo os valores verificados registrados em ficha própria para controle (APÊNDICE 2-A, 2-B e 2-C).

4.2.4 Indução da inflamação com Carragenina

A indução da inflamação na ATM dos animais, na presente pesquisa, foi realizada com Carragenina a 1% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), diluída com água para injeção (Halexistar Indústria Farmacêutica, Goiania-GO-Brasil).

Para tanto, a região periauricular direita de cada rato foi tricotomizada e limpa com solução de iodo-povidine (Riodeine-Rioquímica Indústria Farmacêutica, São José do Rio Preto-SP-Brasil) e, então, procedeu-se a injeção da carragenina com o auxílio de uma seringa de insulina-100U (BD Ultra-Fine- agulha 12,7 mm de comprimento e 0,33 mm de calibre, Becton Dickinson, Juiz de Fora-MG-Brasil) cuja ponta da agulha foi inserida na região imediatamente inferior ao processo zigomático do osso temporal, sendo em seguida movimentada mesio-anteriormente em direção ao espaço articular onde 50 μ L da substância indutora foi injetada lentamente na ATM direita (GOULART et al, 2005).

4.2.5 Tratamentos e procedimentos realizados

Os 45 animais selecionados para essa etapa da pesquisa foram divididos em 03 grupos (n=15) de acordo com o tipo de procedimento aos quais seriam submetidos (Tabela 3). No grupo CRG (Grupo Controle), os ratos receberam somente a injeção de carragenina a 1% na articulação direita. Os animais destinados ao tratamento com Diclofenaco Sódico foram induzidos com carragenina como anteriormente descrito. Transcorridas 1 hora da indução da inflamação, os animais receberam a primeira injeção intraperitoneal (i.p.) de 10 mg\Kg com diclofenaco sódico (Voltaren[®] 75 mg/3mL-Solução Injetável- Novartis Biociências S.A., São Paulo-SP-Brasil). As injeções se repetiram a cada 24 horas durante 07 dias, a exceção dos grupos eutanasiados após 24 horas e 03 dias.

A fotobiomodulação à Laser foi realizada da maneira anteriormente descrita para indução com formalina, utilizando-se do mesmo aparelho (Laser diodo semi-condutores GaAlAs³, Laser Twin-MMOptics® - São Carlos-SP, Figura 3) no espectro eletromagnético Infravermelho (IV), área do spot (0,04 cm²). A fluência utilizada foi de 52,5 J/cm², a potência de 70 mW e o tempo utilizado foi de 30 segundos, conforme demonstrado na tabela 3. A

³ GaAlAs – relativos aos meios semicondutores Gálio, Alumínio e Arseneto.

primeira aplicação da FLBP foi realizada, 1 hora após a indução da inflamação com a carragenina, sendo as demais aplicações realizadas a cada 48 horas, à exceção dos animais eutanasiados após 24 horas após a indução inflamatória.

É importante mencionar que as injeções intraperitoneais com solução salina a 0,9% realizadas imediatamente e diariamente pós-indução com o agente flogístico, assim como, as irradiações periódicas com FLBP com a fluência de 0,0 J/cm² foram realizadas em todos os animais experimentais, a fim de garantir que os mesmos fossem submetidos às mesmas condições de estresse, como já citado anteriormente.

4.2.6 Divisão dos subgrupos

Os ratos selecionados foram divididos aleatoriamente em 03 grandes grupos, que diferiram quanto à forma de tratamento utilizado, como demonstrado na tabela abaixo:

Tabela 3: Distribuição dos animais experimentais de acordo com o tipo de tratamento preconizado para a realização da avaliação histomorfológica.

Grupos (n=15)	ATM direita
CRG	Carragenina a 1% + injeções intraperitoneais diárias com solução salina a 0,9% (0,2 mL) + irradiação com FLBP na fluência de 0,0 J/cm ²
DFN	Carragenina a 1% + injeção diária com diclofenaco sódico (10 mg/kg de peso i.p) + irradiação com FLBP na fluência de 0,0 J/cm ²
LST2	Carragenina a 1% + + injeções intraperitoneais diárias com solução salina a 0,9% (0,2 mL) + FLBP na fluência de 52,5J/cm ²

Como passo seguinte, cinco animais de cada grupo passaram pelo processo de eutanásia por overdose de anestésico geral, obedecendo aos períodos de 24 horas, 03 e 07 dias após realização da indução da inflamação com carragenina, a fim de proceder à análise histomorfológica dos espécimes de ATM. Para tanto, a cabeça do animal foi removida, os tecidos moles não-articulares foram cirurgicamente removidos (Lâminas de Bisturi nº 23D, Medblade- Med Goldman Indústria e Comércio LTDA, Manaus-AM-Brasil; Tesouras Metzembbaum curva e reta-Golgran Ind. Com. Instr. Ltda, São Paulo-SP-Brasil) e, então, a

cabeça foi imersa em formol tamponado a 10% (Formaldeído a 37% P.A.- Neon Comercial Ltda, São Paulo-SP-Brasil) por um período mínimo de 07 dias, para fixação. Após esse período a peça foi removida do formol, lavada em água corrente e imersa em ácido nítrico a 10% (ácido nítrico a 65% P.A., Synth-Labsynth produtos para laboratórios Ltda., Diadema-SP-Brasil), com trocas diárias, até completa descalcificação.

4.2.7 Análise histomorfológica

Após a fixação e procedimentos de descalcificação dos espécimes cirurgicamente obtidos, foi realizada a etapa de macroscopia iniciada pela secção sagital do crânio, com o auxílio de lâmina de bisturi nº 23D (Medblade- Med Goldman Idústria e Comércio LTDA, Manaus-AM-Brasil) presa ao cabo nº 04 (Golgran Ind. Com. Instr. Ltda, São Paulo-SP-Brasil) com cuidado para não desarticular a ATM (Figura 4-A). A partir de então, foi realizada a remoção das ATMs: direita, cerca de 30 mm aquém da superfície articular do côndilo, com o cuidado de preservar a área articular, a fim de que a capsula articular, bem como, a fáscia muscular, imediatamente adjacente pudesse ser ulteriormente analisadas (Figura 4-B). Posteriormente, as articulações foram desidratadas, diafanizadas e emblocadas em parafina (Figura 4-C e 4-D). Secções histológicas de 5 μm foram obtidas, coradas em hematoxilina/eosina e analisadas em microscopia de luz (Microscópio Olimpus, modelo-CX31 com câmara Olimpus modelo C7070 acoplada).

As variáveis histomorfológicas analisadas foram observadas e mensuradas de acordo com a região anatômica da articulação temporomandibular conforme descrito por Goulart et al (2005). Descrever o infiltrado celular e o tipo do infiltrado, edema do tecido mole periarticular, vasos congestionados, alterações na capsula articular, hiperplasia no revestimento sinovial e alterações na superfície articular. As variáveis: intensidade do infiltrado inflamatório e vasodilatação foram categorizadas de acordo com a intensidade com que se manifestaram morfológicamente nos tecidos, obedecendo aos seguintes critérios: 0 – ausente; 1 – leve (menos de 10% da área analisada); 2 – moderada (entre 10 a 50% da área analisada); 3 – severa/intensa (superior a 50% da área analisada), conforme metodologia descrita por Dantas et al., (2011). As médias dos escores de cada grupo, e em cada período experimental, foram obtidas por meio da somatória dos escores evidenciados em cada secção histológica examinada, dividida por 10 (número de secções histológicas avaliadas).

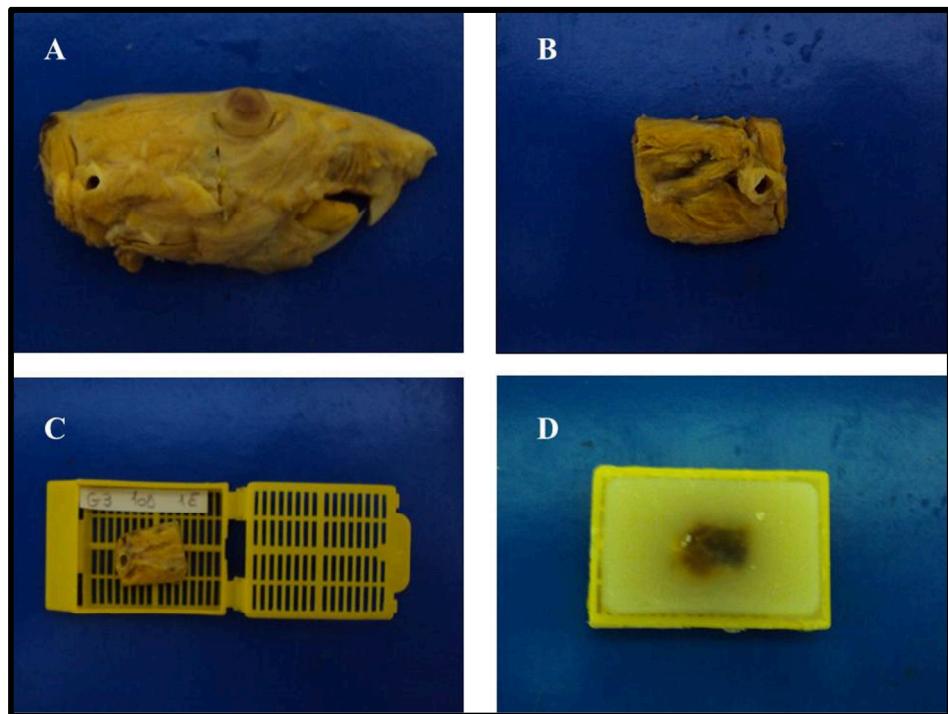


Figura 4. Imagem das etapas de preparação do material para análise histomorfológica. (A) corte sagital da cabeça do animal experimental; (B) corte da área representativa da ATM e áreas adjacentes; (C) colocação do corte da ATM no cassete com identificação (D) emblocamento da peça em parafina.

4.3-ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

4.3.1- Avaliação Antinociceptiva

Dados com homogeneidade de variância foram analisados utilizando o teste de One-Way, análise de variância (ANOVA) e comparações múltiplas *post-hoc* foram também realizadas pela aplicação do Teste de Tukey. Um nível de probabilidade menor do que 0,05 foi considerado como indicativo de significância estatística. Dados são apresentados em figuras no texto como $\text{médias} \pm \text{SEM}$. O programa utilizado para a realização dos cálculos estatísticos foi Graphpad Prism Versão 5.0 (Graphpad Software Inc).

4.3.2- Avaliação Histomorfológica

Os dados com homogeneidade de variância foram analisados utilizando-se o Teste de Kruskal-Wallis e as comparações múltiplas *post-hoc* foram realizadas pela aplicação do Teste de comparações múltiplas de Dunn. Um nível de probabilidade menor do que 0,05 foi considerado como indicativo de significância estatística. Dados são apresentados em figuras

no texto como médias \pm SD. O programa utilizado para a realização dos cálculos estatísticos foi Graphpad Prism Versão 5.0 (Graphpad Software Inc).

5-RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO ANTINOCICEPTIVA

As avaliações foram realizadas levando-se em consideração os comportamentos de coçar a região orofacial (CO), o ato de levantar a cabeça (LC), sinais da presença de dor induzida pela injeção com agente químico. Para cada ato de LC observado foi contabilizado 1 segundo, quando a soma dos comportamentos foi considerada. Nesse ínterim, injeções de formalina a 2,5% dentro da ATM direita de ratos induziram comportamentos nociceptivos caracterizados pelo ato de levantar a cabeça (LC) e de coçar a região orofacial (CO), como observado na figura 5.

Quando da análise dos tratamentos avaliados no presente trabalho, o pré-tratamento dos animais experimentais com diclofenaco sódico reduziu os comportamentos de LC ($p<0.05$) e de CO ($p<0.01$) quando avaliados individualmente, bem como, apresentou marcada redução quando os comportamentos tiveram seus dados somados ($p<0,001$).

Tendo em vista, ainda a análise da figura 5 é possível verificar que dentre os protocolos FLBP utilizados na presente pesquisa, o LST1 ($12,5 \text{ J/cm}^2$) não apresentou atividade antinociceptiva, uma vez que não foi capaz de reduzir os comportamentos de CO e LC, induzidos pela injeção de formalina a 2,5% na ATM, quando avaliados individualmente ou pela soma de ambos os comportamentos. Já em relação aos grupos LST2 ($52,5 \text{ J/cm}^2$) e LST3 ($87,5 \text{ J/cm}^2$) foi observada nítida atividade antinociceptiva em ambos os protocolos, especialmente quando analisada a soma dos comportamentos (LC + CO), considerada como importante índice de dor na ATM ($p<0,001$). Ao se avaliar os comportamentos separadamente, o LST2 foi capaz de promover significativa diminuição nos comportamentos nociceptivos de CO ($p<0,001$) e LC ($p<0,001$). Já quando o LST3 foi considerado, este somente foi capaz de reduzir o comportamento nociceptivo de LC ($p<0,001$).

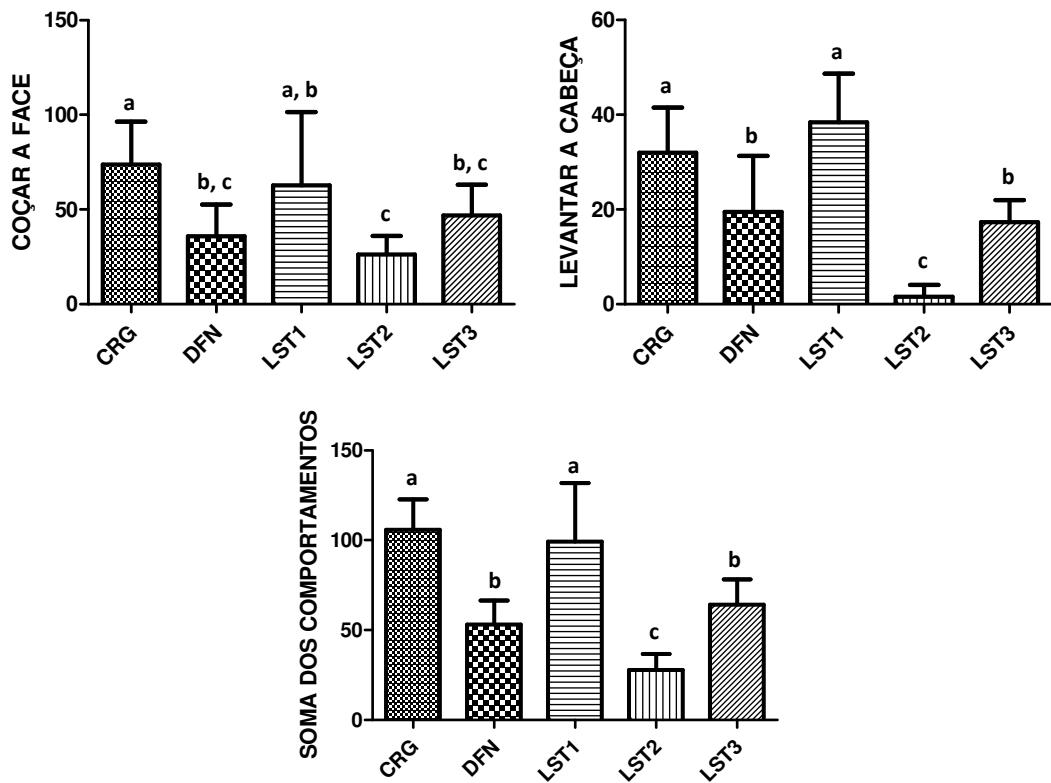


Fig. 5. Avaliação da resposta antinociceptiva nos grupos experimentais: CRG, DFN, LST1, LST2 e LST3 levando-se em consideração os comportamentos de levantar a cabeça e coçar a face, analisados individualmente e de maneira combinada. * $p<0,05$, ** $p<0,01$ e *** $p<0,001$. Letras diferentes nas colunas de cada gráfico representam valores significativamente diferentes ($p<0,05$). (Testes estatísticos utilizados: Análise de variância (ANOVA) e comparações múltiplas *post-hoc* de Tukey).

5.2 AVALIAÇÃO HISTOMORFOLÓGICA

Os resultados da avaliação histomorfológica foram mensurados em três momentos. No período de 24 h (Fig. 6), todos os grupos exibiram infiltrado inflamatório variando de moderado a intenso, particularmente concentrado na região retrodiscal da ATM, além de apresentar hiperplasia de leve a moderada na cabeça do côndilo e formação de vilosidades articulares. No grupo CGR, o infiltrado inflamatório estava composto por polimorfonucleares neutrófilos, em associação a áreas suaves de necrose liquefativa consistindo da formação de microabscessos e por intenso edema intersticial. Na periferia, foram evidenciadas extensas áreas hemorrágicas, além de intensa congestão venosa (hiperemia passiva), tendo observado também ampliação do espaço articular. No grupo DFN, embora tenha sido verificado intenso infiltrado inflamatório rico em neutrófilos, também se observou uma presença notável de

linfócitos e de histiócitos na região periférica. Verificou-se ainda uma intensa hiperemia passiva e suave neoformação periférica de vasos sanguíneos capilares. No LST2, por outro lado, a resposta inflamatória foi constituída predominantemente por linfócitos e por histiócitos, muito embora ocasionais polimorfonucleares neutrófilos pudessem ser vistos. Nas áreas periféricas, existiu marcada proliferação de células fusiformes (consistindo de fibroblastos e angioblastos), além de neoformação de vasos sanguíneos capilares.

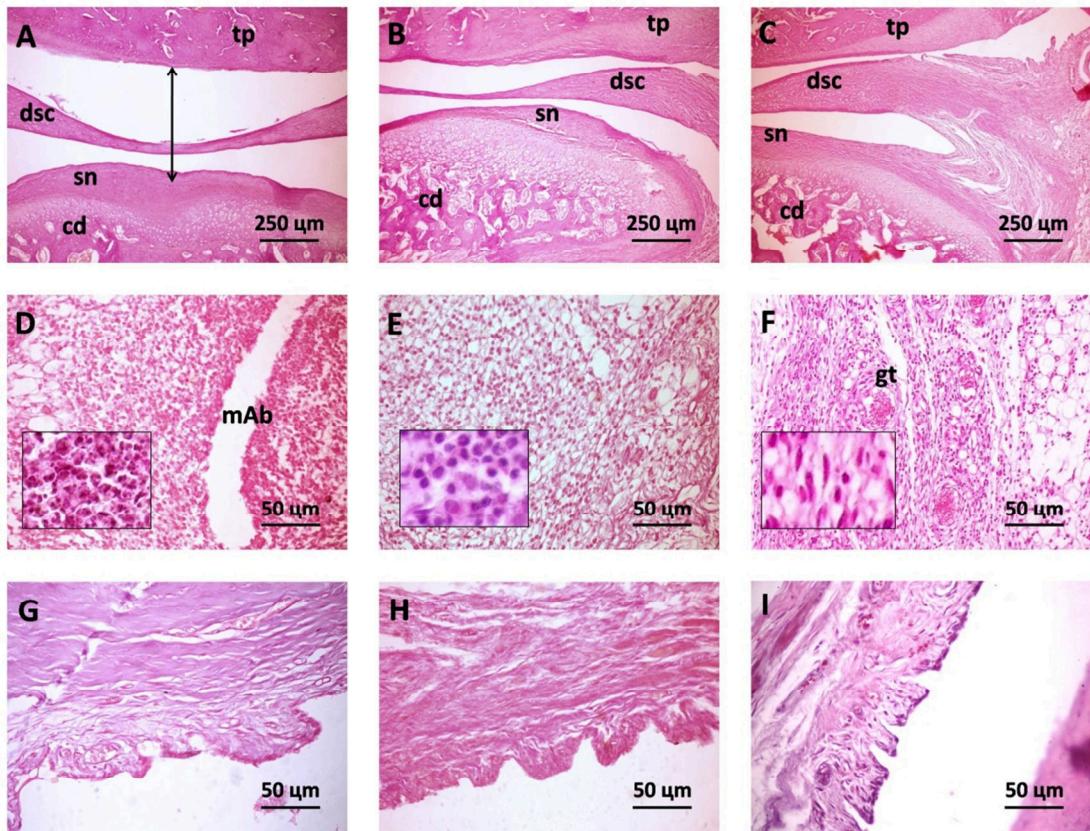


Fig. 6. Secções histológicas coradas em HE dos grupos experimentais em 24h. (A - C) Espaço articular da ATM dos grupos: CRG, DFN e LST2, respectivamente, mostrando a cabeça do côndilo (cd), o disco articular (dc) e o osso temporal (tp). Observa a ampliação do espaço articular em CRG (seta com duas pontas). (D – F) região retrodiscal da ATM, mostrando (D) intenso infiltrado inflamatório em CRG (neutrófilo em grande aumento), com formação de microabscessos (mAb); (E) Infiltrado de linfócitos e neutrófilos em DFN (linfócitos em grande aumento), com formação de microabscessos; e (F) Tecido de granulação imaturo e presença de infiltrado inflamatório rico em neutrófilos (gt) em LST2 (fibroblastos em grande aumento). (G – I) Formação de vilosidades articulares observadas em CGR, DFN e LST2, respectivamente.

No período de 03 dias (Fig. 7), existiu notável infiltrado inflamatório crônico na área retrodiscal de CRG e DFN, muito embora o conteúdo vascular estivesse mais evidente no último grupo. Entretanto, o grupo LST2 apresentou tecido de granulação abundante composto por vascularização exuberante, proliferação de fibroblastos e depósito de delicadas fibras

colágenas recém-formadas. A hiperplasia sinovial da cabeça do côndilo estava claramente evidente nos grupos CRG e DFN, mas não no LST2. Além disso, vilosidades foram encontradas nos três grupos, mas elas pareceram ser maiores no grupo DFN e LST2 do que no CRG.

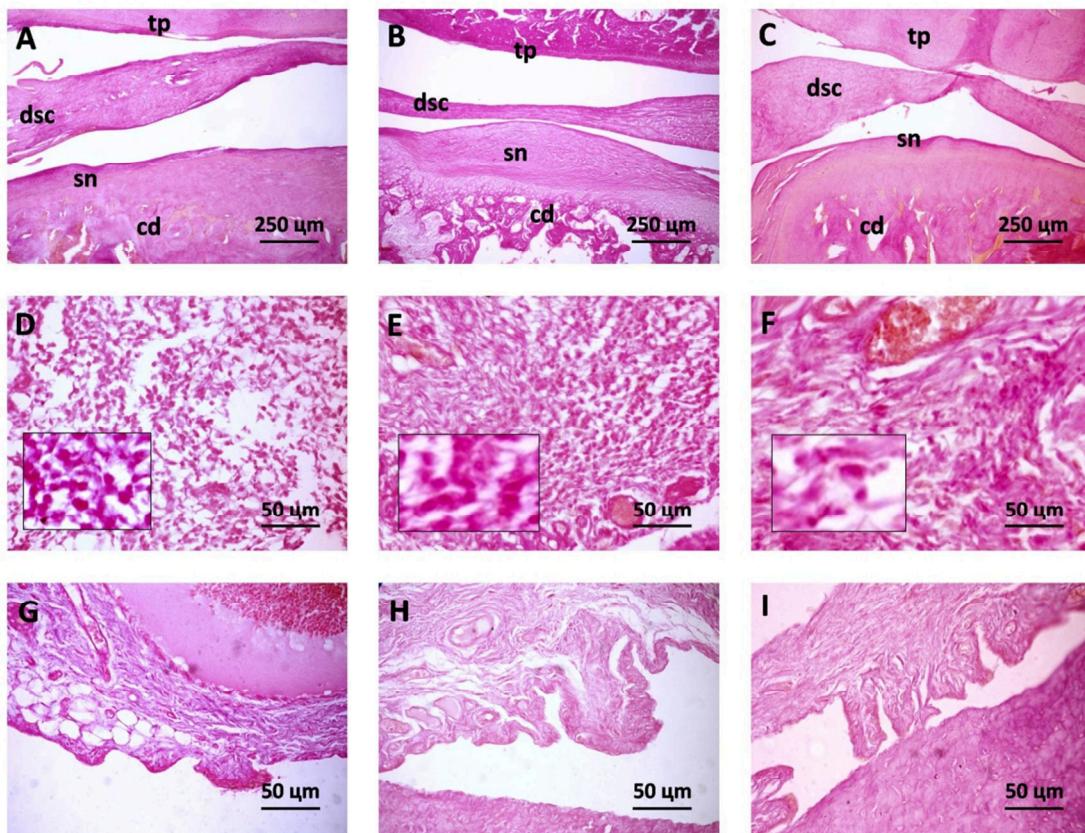


Fig. 7. Secções histológicas coradas em HE dos grupos experimentais no período de 03 dias. (A - C) Espaço articular da ATM dos grupos: CRG, DFN e LST2, respectivamente, mostrando a cabeça do côndilo (cd), o disco articular (dc) e o osso temporal (tp). (D- E) região retrodiscal da ATM mostrando (D) intenso infiltrado inflamatório em CRG (linfócito em grande aumento); (E) Infiltrado de linfócitos e tecido de granulação altamente vascularizado em DFN (linfócitos em grande aumento); e (F) tecido de granulação rico em fibroblastos e delicadas fibras colágenas em LST2 (fibroblastos em grande aumento). (G) Formação de baixas vilosidades em CRG, enquanto em DFN (H) e LST2 (I) mostraram vilosidades pronunciadas..

No período de 07 dias (Fig. 8), foi observado no grupo CRG esparsas células inflamatórias de característica crônica, bem como, esparsos vasos capilares hiperêmicos. A região retrodiscal de DFN era composta de tecido conjuntivo moderadamente colagenizado e hipocelular, exibindo esparsos vasos capilares hiperêmicos. No grupo LST2, o tecido conjuntivo mostrou-se mais denso e compacto, com nenhum sinal de hiperemia capilar persistente. Na fossa articular, não foi observada nenhuma notável alteração histológica,

exceto por uma suave hiperplasia sinovial. Novamente, foram observadas alterações vilosas nos 03 grupos, as quais foram claramente mais expressivas nos grupos DFN e LST2.

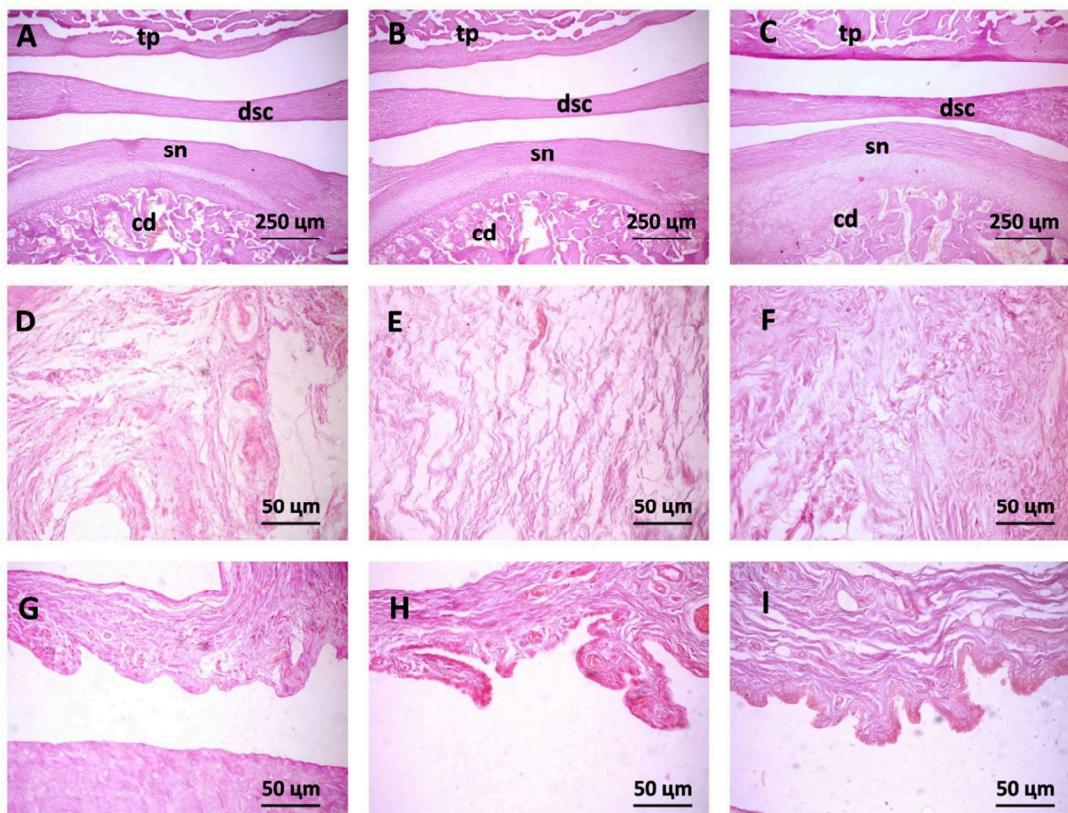


Fig. 8. Secções histológicas coradas em HE dos grupos experimentais no período de 07 dias. (A - C) Espaço articular da ATM dos grupos: CRG, DFN e LST2, respectivamente, mostrando a cabeça do côndilo (cd), o disco articular (dc) e o osso temporal (tp). (D – E) Região retrodiscal da ATM mostrando tecido conjuntivo fibroso moderadamente colagenizado e hipocelular, com alguns poucos capilares hiperêmicos em CRG (D) e DFN (E), porém apresentando-se mais denso e mais compacto no grupo LST2 (F). (G – I) Foi observada a formação de vilosidades articulares em CRG, DFN e LST2, respectivamente. (G) Formação de discretas vilosidades articulares em CRG, enquanto nos grupos DFN (H) e LST2 (I) as vilosidades eram bastante expressivas.

A figura 9 mostra uma análise comparativa dos resultados obtidos com a avaliação do CRG, do DFN e do LST2. A intensidade da resposta inflamatória foi significativamente reduzida no grupo LST2 comparados aos grupos não tratados (CRG) no período de 24 h ($p<0,001$), 03 dias ($p<0,001$) e em 07 dias ($p<0,01$). Comportamento similar foi observado no grupo DFN, o qual apresentou mais baixos escores de resposta inflamatória do que CRG em 24h ($p<0,05$), em 03 dias ($p<0,01$) e em 07 dias ($p<0,01$). Em adição, os escores inflamatórios observados em LST2 foram significativamente mais baixos do que os verificados em DFN em 24 h ($p<0,01$) e em 03 dias ($p<0,001$), mas não no período de 07 dias ($p>0,05$). Em relação ao conteúdo de vasos recém-formados, encontrou-se que LST2 exibiu aumentados escores de

vascularização do que CRG e DFN em 24 h ($p<0,001$ e $p<0,01$) e em 03 dias ($p<0,001$ e $p<0,001$), mas não em 07 dias ($p>0,05$). Ressalte-se que somente no período de 24 h, o conteúdo venoso mostrou aumento significativo em DFN em comparação com CRG ($p<0,001$).

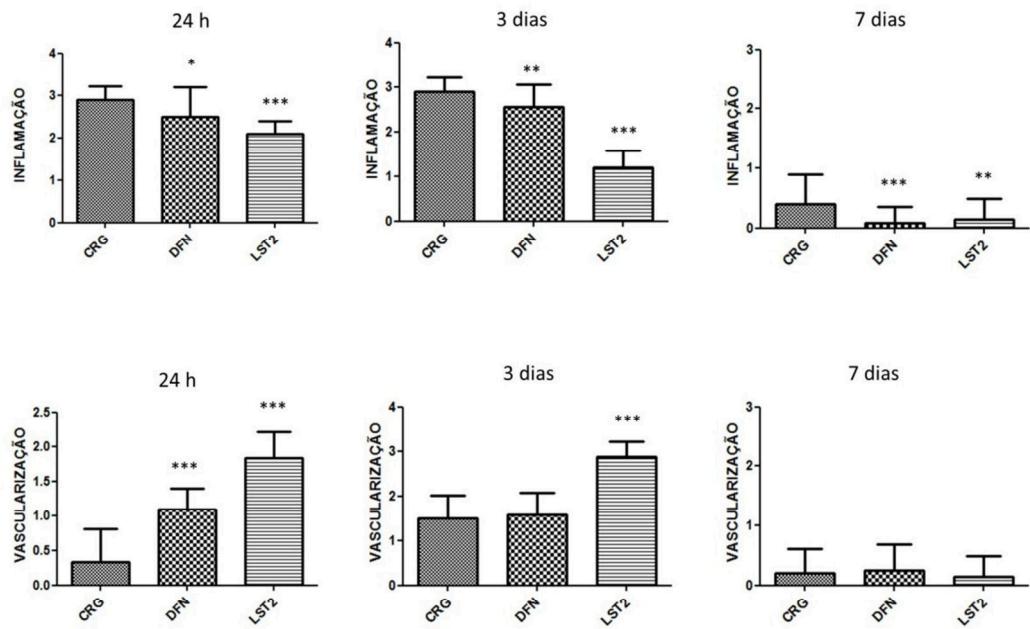


Fig. 9. Avaliação da resposta inflamatória e do padrão de vascularização nos grupos CRG, DFN e LST2 durante os 03 períodos analisados. * $p<0,05$, ** $p<0,01$ e *** $p<0,001$ (os grupos são significativamente diferentes de CRG). (Testes estatísticos utilizados: Teste Estatístico de Kruskal-Wallis e *post-hoc* de Dunn).

6 DISCUSSÃO

Nas DTM, a presença de dor é um achado comum resultante, frequentemente, da presença de processo inflamatório instalado que pode afetar músculos associados e a própria ATM. O tratamento normalmente associa a utilização de drogas anti-inflamatórias, em especial, dos AINES que atuam na inibição das isoformas da cicloxigenase. Contudo, apesar de essas drogas apresentarem efeito inibitório sobre a inflamação, com consequente redução da sintomatologia dolorosa, o seu uso crônico pode gerar para o organismo efeitos tais como: problemas gástricos colaterais, tais como úlceras gástricas e nefrotoxicidade (ISHIMARU et al., 2003). Sendo assim, a FLBP aparece como uma alternativa não-invasiva para o controle da dor e inflamação sem a presença de efeitos colaterais para o organismo ou tecido irradiado (SIMUNOVIC, 1996; BJÖRDAL et al., 2003; VENANCIO, CAMPARIS, LIZARELLI, 2005; NÚÑEZ, et al., 2006; SANDOVAL et al., 2009; DE BEM et al., 2010; KUCUK et al., 2010; AHRARI et al., 2013), além da vantagem de produzir recuperação mais rápida do tecido (VENANCIO et al., 2005).

No presente estudo, o potencial analgésico orofacial do FLBP foi avaliado frente à nocicepção induzida pela injeção de formalina a 2,5% na ATM de ratos, a qual se caracteriza por ser um estímulo nocivo comumente usado em experimentos comportamentais em animais, que apresenta duas fases distintas (ROVERONI et al., 2001). A primeira fase caracteriza-se por apresentar uma resposta de curta duração, entre 0 e 5 minutos após a indução do estímulo álgico, e é representada pela estimulação direta de nociceptores periféricos (DUBUSSON, DENNIS, 1977; ROSLAND et al., 1990; ABBOTT, FRANKLIN, WESTBROOK, 1995; ROVERONI et al., 2001, ZEREDO et al., 2005; MIRANDA, SIERRALTA, PRIETO, 2009). A segunda fase é uma contínua e prolongada resposta que se inicia aproximadamente 12 minutos após a indução da dor e que pode durar até 30 minutos, se assemelhando ao quadro de dor aguda pós-injúria verificada em humanos e reflete a integração entre sinalizadores centrais e periféricos (ROSLAND et al., 1990; ABBOTT, FRANKLIN, WESTBROOK, 1995; ROVERONI et al., 2001, ZEREDO et al., 2005; MIRANDA, SIERRALTA, PRIETO, 2009). Entre essas duas fases existe um período de aquiescência que pode durar de 09 a 15 minutos (DALLEL et al., 1995; ROVERONI et al., 2001; CAPUANO et al., 2009).

Outro aspecto importante que foi levado em consideração na elaboração da metodologia do presente trabalho reside no intervalo de tempo limitado para avaliação

antinociceptiva quando da utilização da formalina como agente algésico_ cerca de 60 minutos_ (DUBUSSON, DENNIS, 1977), justificando desta forma, a única aplicação de cada protocolo na ATM induzida para avaliação do efeito analgésico da FLBP. Essa metodologia ainda respeitou outro aspecto da laserterapia relacionado ao fato de que a atividade dessa modalidade de tratamento somente ocorre quando da presença de alguma alteração na função celular do tecido a ser irradiado (PINHEIRO, BRUGNERA, ZANIN, 2010; CARVALHO et al, 2011). O trabalho de Carvalho et al. (2011) suporta essa afirmativa quando em seus resultados, não foi verificada a melhora dos níveis inflamatórios na ATM pós-indução com agente flogístico, quando da aplicação prévia da FLBP. Os resultados do trabalho destacado também confirmaram o comprimento de onda de λ 780 nm como capaz de produzir efeito anti-inflamatório.

Ressalta-se que o caráter bifásico da dor produzida pela injeção com formalina acontece independente do tecido induzido e pode ser aferido em tempo real com o animal em vigília, o que auxilia na máxima reproduzibilidade dos aspectos relacionados à sintomatologia dolorosa (DUBUSSON, DENNIS, 1977; ROSLAND et al., 1990; ABBOTT, FRANKLIN, WESTBROOK, 1995; ROVERONI et al., 2001, ZEREDO et al., 2005; MIRANDA, SIERRALTA, PRIETO, 2009).

O teste com formalina é um modelo reconhecido de avaliação nociceptiva para verificação do efeito de tratamentos utilizados para o controle da dor na região orofacial (RABOISSON, DALLEL, 2004; ROVERONI et al., 2001; CAPUANO et al., 2009). Embora já existam estudos que avaliem o efeito do laser de baixa potência na inflamação induzida na ATM de ratos, para o nosso conhecimento, esse é o primeiro trabalho que avalia o efeito do FLBP sobre a nocicepção induzida com formalina na região da ATM. Para tanto foram utilizados 03 protocolos dentro da faixa de comprimento de onda de 780 nm, que é recomendado pela *World Association for Laser Therapy* (WALT) para o tratamento de DTM com atividade já atestada na literatura (TORRICELLI et al., 2001; CARVALHO et al., 2011).

A avaliação das três fluências de FLBP para o tratamento de DTM justifica-se pelo fato de que existem diferentes protocolos na literatura indicados com o propósito de promover efeitos: anti-inflamatório (BARBERIS et al., 1995; BARBERIS et al., 1996; OZDEMIR, BIRTANE, KOKINO, 2001; MIZUTANI et al., 2004; PALLOTTA et al., 2012), além do efeito analgésico (SIMUNOVIC, 1996; PINHEIRO et al., 1997; PINHEIRO et al., 1998; TORRICELLI et al., 2001; BJÖRDAL et al., 2003; MIZUTANI et al., 2004; FERREIRA et al., 2005; KATO et al., 2006; NÚÑEZ et al., 2006; FIKÁCKOVÁ et al., 2007; MAZZETTO et al., 2007; CARVALHO et al., 2010; MAZZETTO, HOTTA, PIZZO, 2010; SANTOS et al.,

2010; DA SILVA et al., 2012; DOSTALOVÁ et al., 2012; MAIA et al., 2012; SALMOS-BRITO et al., 2013). Contudo ainda não existe consenso a respeito do adequado parâmetro de doses com melhor resultado para as funções supramencionadas da terapia com laser.

Dentre os protocolos utilizados no presente trabalho, o LST2 (fluência de 52,5 J/cm² e potência de 70 mW), mostrou-se o mais efetivo no controle nociceptivo em ambas as fases do teste da formalina à 2,5% na ATM, mesmo quando comparado aos resultados obtidos com o diclofenaco sódico. Esses dados encontram respaldo no estudo de Da Silva et al. (2012) que utilizaram o mesmo aparelho e mesmo protocolo do grupo supramencionado e verificaram resultados positivos no controle da sintomatologia dolorosa e na recuperação dos movimentos mandibulares dos pacientes tratados com fototerapia. Pallotta et al. (2012) utilizaram fluência semelhante a aqui discutida para avaliação do efeito do laser sobre as condições inflamatórias articulares (50 J/cm²) e encontraram efeito sobre os mediadores da inflamação, chamando atenção para a atividade sobre a PGE₂, importante marcador inflamatório, responsável pela dor que acompanha o processo inflamatório (ALMEIDA et al., 2013).

É importante ressaltar que o LST3 (fluência de 87,5 J/cm² e potência de 70 mW), também apresentou uma resposta positiva no controle nociceptivo quando a soma dos comportamentos (LC e CO) foi levada em consideração. Entretanto, esse mesmo protocolo não foi efetivo em reduzir o comportamento de coçar a região da face, quando avaliado separadamente. De acordo com Clavelou et al. (1995), o persistente ato de coçar a face no lado que recebeu estímulo álgico é um comportamento que sinaliza a presença de dor, especialmente quando ocorre na segunda fase após a injeção com formalina em concentrações variando entre 0,5 e 5,0%. No entanto, é fato que os dois comportamentos quando avaliados em conjunto retratam melhor a intensidade da dor aferida em comparação aos comportamentos quando avaliados separadamente (ROVERONI et al., 2001). Portanto, é possível sugerir que este protocolo pode ser útil no controle da sensação álgica induzida por inflamação da ATM.

Ratificando essa hipótese, estudo clínico desenvolvido por Mazzetto et al. (2007), no qual foi utilizada fluência semelhante (89,7 J/cm²) e o mesmo comprimento de onda (λ780nm) para a irradiação da ATM, demonstraram o efeito analgésico em pacientes com DTM, bem como a melhora das funções mandibulares dos pacientes tratados.

Várias são as explicações sugeridas para o efeito analgésico do FLBP, que incluem a liberação de β-endorfinas, aumento do limiar de dor do paciente, redução da liberação de mediadores químicos envolvidos com a sintomatologia dolorosa, aumento da produção de ATP, melhora da microcirculação local e aumento do fluxo linfático, com resultante redução

do edema local (SIMUNOVIC 1996; MAZZETTO et al., 2007; MAZZETTO, HOTTA, PIZZO, 2010). Adicionalmente, ao considerar que a dor observada nos músculos e ATM está associada à redução do fluxo sanguíneo e a presença de edema local (SIMUNOVIC, 1996; TULLBERG et al., 2003), tem sido sugerido que o efeito positivo da terapia laser, incluindo a propriedade da luz laser em reduzir a dor, estaria associada a sua capacidade de estimular a microcirculação no tecido irradiado (PINHEIRO et al., 2003). Este estímulo, por sua vez, resultaria na alteração da acidose e a remoção das substâncias promotoras de dor (MIZUTANI et al., 2004)

No presente trabalho foi verificado efeito analgésico com a utilização dos protocolos 52,7 J/cm² e 87,5 J/cm² com uma única irradiação realizada logo após a indução algésica da ATM dos animais experimentais com a formalina a 2,5%. Esses resultados contrariam a literatura consultada que indica a necessidade da realização de sucessivas irradiações para a obtenção do controle da dor (PINHEIRO et al., 1997; KATO et al., 2006; MAZZETTO et al., 2007). É importante enfatizar que os trabalhos utilizados para fins comparativos dos resultados aqui apresentados tratam-se de avaliações clínicas do efeito analgésico da FLBP em humanos, que foram utilizadas devido ao fato de que a literatura ainda é escassa no que diz respeito à divulgação de relatos que abordem o efeito do laser no controle da dor na ATM em condições experimentais no âmbito laboratorial.

É possível que a utilização imediata da FLBP na faixa do infravermelho (IV) tenha facilitado a atuação do laser na ATM dos animais avaliados, uma vez que a literatura afirma que o laser IV (780-904 nm \pm 10 nm) tem maior poder de penetração no tecido afetado do que os situados na região vermelha (V), com menores comprimentos de onda (632,8-750 nm \pm 10nm) (BJÖRDAL et al., 2003; AHRARI et al., 2013). A literatura também chama a atenção para o fato de que a luz laser é capaz de bioestimular as células em profundidade no tecido, aprimorando o desenvolvimento da cascata de efeitos biológicos associados ao processo de reparação de tecidos e células sob injúria (PARKER, 2007). Essas duas explicações podem ter justificado os resultados favoráveis obtidos na pesquisa em questão, levando-se em consideração que a ATM dos ratos apresenta-se situada cerca de 3 mm a partir da superfície, profundidade essa favorecida pela irradiação com o laser IV (BJÖRDAL et al., 2003; PINHEIRO et al., 2003).

Deve ser destacado que o laser na região do IV pode penetrar cerca de 2 mm antes de ser verificada alguma perda de energia, ao contrário do laser V que somente penetra 0,5-1 mm perdendo em torno de 37% de energia durante a irradiação (BASFORD, 1995). Estes dados imputam uma clara indicação para a utilização do FLBP IV nas desordens verificadas na

ATM, já que lasers com comprimentos de onda maiores resistem mais a dispersão do que aqueles que apresentam valores inferiores (KOLÁROVÁ, DITRICHOVÁ, WAGNER, 1999).

Para a utilização da laserterapia para o tratamento das DTM a literatura indica a associação de diferentes comprimentos de ondas na faixa do V e do IV com a justificativa de que este agiria na profundidade do tecido, enquanto aquele agiria na sua superfície, em nível muscular (CARVALHO et al., 2010). Entretanto, os resultados aqui apresentados sugerem que a utilização de um único comprimento de onda na região do IV (780 nm) foi eficiente em obter redução do processo inflamatório induzido na ATM de ratos com a carragenina a 1%, bem como em acelerar o processo de reparo do tecido. Esses achados são suportados na literatura consultada que encontraram melhor efeito da utilização da FLBP com laser com 780 nm do que quando da associação deste com laser 660 nm (CARVALHO et al., 2011).

A FLBP também apresenta a capacidade biomoduladora e bioestimuladora sobre o tecido alvo. Essa propriedade da luz laser está associada à estimulação do citocromo C oxidase, que é uma enzima terminal da cadeia respiratória mitocondrial e partícipe na produção de trifosfato de adenosina (ATP), e que se acredita ser um dos principais fotorreceptores para o metabolismo celular na laserterapia (KARU, KOLYAKOV, 2005; PARKER, 2007; KARU et al., 2008; BENEDICENTI et al., 2008; KARU, 2010a; KARU, 2010b). De acordo com Karu (2010a) essa enzima atua sobre as mitocôndrias promovendo a fotobiomodulação em nível celular, através de fotorreceptores específicos na enzima anteriormente citada, que se acredita serem os componentes de valência mista do cobre da molécula enzimática que quando excitados por ação da luz laser estimulariam o metabolismo celular. Tem sido sugerido que a fotosensibilização dessa enzima ocorre quando o laser é utilizado respeitando a faixa de comprimento de onda de 660-860 nm, ou seja, na região do espectro V e próximo ao IV (KARU, KOLYAKOV, 2005; KARU, 2010a).

O LST1 foi o único protocolo dentre os aqui utilizados, que não apresentou resposta antinociceptiva significativa nas condições experimentais desenvolvidas no trabalho. Esses dados estão de acordo com os apresentados por Kucuk et al (2010), que afirmaram que a fluência de 12 J/cm² não foi capaz de promover efeito anti-inflamatório e analgésico. Adicionalmente, Fikácková et al. (2007) também avaliaram duas diferentes densidades de energia do laser diodo (10J/cm² e 15J/cm²), ambos muito próximas a fluência utilizada nessa pesquisa, e concluíram que ambas as fluências não foram eficientes no controle da dor aguda causada pela DTM. Por outro lado, quando ambos os protocolos foram utilizados para o tratamento de pacientes com dor crônica, eles obtiveram resultados positivos, sugerindo que fluências próximas àquelas utilizadas neste estudo experimental podem ser úteis para o

controle de dores crônicas da ATM, mas não em condições agudas. É possível afirmar, ainda, que quando da irradiação do tecido, parte da energia é perdida conforme a luz vai penetrando no seu interior (PINHEIRO et al., 2003). Uma vez que nos três protocolos de FLBP utilizados no trabalho houve somente variação em relação às fluências do laser utilizado, bem como, no tempo de irradiação, pode-se inferir que os resultados negativos obtidos no grupo LST1 poderiam ser resultado de insuficiência da densidade de energia reduzindo desta maneira a capacidade de estimulação tecidual.

A literatura cita que o efeito analgésico do laser está relacionado à sua propriedade anti-inflamatória (BJÖRDAL et al., 2003; ZEREDO et al., 2005), embora não haja consenso a respeito do real mecanismo anti-inflamatório e analgésico da FLBP. Entretanto, é sabido que esses efeitos dependem, além da correta dose de irradiação (SIMUNOVIC, 1996; PINHEIRO et al., 1997; PINHEIRO et al., 1998; OZDEMIR, BIRTANE, KOKINO; 2001; TORRICELLI et al., 2001; PINHEIRO et al., 2003; VENÂNCIO, CAMPARIS, LIZARELLI, 2005), das propriedades ópticas do tecido irradiado que, como já discutido anteriormente, poderá afetar a capacidade de penetração da luz laser (SPIVAK et al., 1992; BJÖRDAL et al., 2003; MAZZETTO et al., 2007; MAZZETTO, HOTTA, PIZZO, 2010; CARVALHO et al., 2011). Nesse sentido, todas as precauções foram tomadas, tais como a utilização de corretos protocolos, além da realização da calibração do aparelho laser com radiômetro antes e após a irradiação da ATM afim de evitar a inapropriada irradiação com o laser, bem como, os efeitos adversos sobre a área irradiada (TORRICELLI et al., 2001).

Desta forma, o conjunto de dados obtidos neste estudo conduz à sugestão de que, dentre os protocolos testados neste experimento, aquele utilizando a fluência de 52,5 J/cm² foi o mais efetivo no controle da dor aguda inflamatória induzida na ATM de ratos.

A literatura classifica a DTM como sendo condições musculoesqueletais com causa multifatorial que, frequentemente, apresenta um componente inflamatório, com consequente presença de sintomatologia dolorosa relatada pelos pacientes (FRICTON, 2004; CARVALHO et al., 2011). Portanto, para verificar se o efeito antinociceptivo promovido por este protocolo estaria de fato relacionado a uma ação anti-inflamatória, foi realizada uma análise histológica da ATM utilizando o modelo experimental da carragenina como agente flogístico.

A carragenina é um agente químico com propriedades inflamatórias e hiperalgésica, cuja ação tem início com a liberação de bradicinina e, consequentemente, de citocinas que incluem o TNF- α e IL1- β , além de prostaglandinas e de aminas simpáticas, responsáveis pela produção de edema local (CUNHA et al., 2008). Deve-se salientar que tanto a bradicinina quanto a histamina são potentes promotores de dor (TJØLSEN, et al., 1992). A opção pela

caragenina deveu-se além do fato de ser um agente químico capaz de desencadear processo inflamatório não antigênico e sem ação sistêmica, por apresentar efeito duradouro (sete dias), conforme preconizado por Goulart et al. (2005). Por esta razão, este mesmo período foi adotado como limite do tempo experimental na presente pesquisa. Essa característica de inflamação produzida pela caragenina possibilita o estudo de efeitos neurais, bem como, comportamentais para tratamentos que necessitam de avaliação em longo prazo, como aqui relatado (CAPRA, RO, 2004).

Apesar da relevância da análise histomorfológica para a melhor compreensão do efeito direto de agentes químicos promotores de inflamação sobre um determinado tecido, bem como do efeito a nível celular dos tratamentos indicados para cada caso em particular, apenas um trabalho com esta abordagem analítica foi previamente descrito na literatura especializada (CARVALHO et al., 2011). Contudo, o presente trabalho representa o primeiro estudo associando a atividade antinociceptiva à ação anti-inflamatória na FLBP em processos inflamatórios em ATM de ratos.

Os resultados aqui apresentados referentes ao período de 24 horas após a indução com a caragenina, mostraram aspectos semelhantes aos apresentados por Goulart et al. (2005), expressos pela presença de um infiltrado inflamatório intenso rico em neutrófilos polimorfonucleares, presença de edema exuberante, além de suaves áreas de necrose liquefativa, sugerindo a presença de microabscessos, bem como de áreas hemorrágicas extensas e congestão de vasos, achados característicos da inflamação aguda. No terceiro dia characteristicamente foi observada a presença de infiltrado inflamatório, contudo de característica crônica. No sétimo dia a inflamação foi bastante atenuada em sua manifestação, mesmo assim, pode ser verificada a presença de esparsos: infiltrado inflamatório e vasos capilares hiperêmicos. Esses resultados confirmaram a capacidade da caragenina a 1% de suscitar a instalação de processo inflamatório de maneira rápida e sustentada na ATM (GOULART et al., 2005; CARVALHO et al., 2011), validando esses achados como padrão para posteriores comparações entre os grupos.

Durante todo o período experimental, DFN e LST2 apresentaram reação inflamatória significativamente menos intensa do que aquela verificada em CRG. Em relação ao DFN é reconhecido o seu potencial em bloquear a cicloxygenase, com consequente redução dos níveis locais de prostaglandinas (MA et al., 2011). Já no que diz respeito à FLBP faz-se mister destacar que os resultados aqui apresentados atestam o seu efeito anti-inflamatório o qual é atribuído à ação de inibir a cascata do ácido aracídônico (MIZUTANI et al., 2004) e, posteriormente de reduzir a síntese de prostaglandinas, em especial da PGE₂ (BARBERIS et

al., 1995; BARBERIS et al., 1996; OZDEMIR, BIRTANE, KOKINO, 2001; PALLOTTA et al., 2012), que uma vez controlada, resulta em consequente redução de outros mediadores inflamatórios, agentes partícipes e reguladores que são da inflamação, produzidos pela membrana sinovial e responsáveis por destruírem a cartilagem articular (BARBERIS et al., 1996). O resultado final é a redução da inflamação, bem como, do edema presentes no local afetado (OZDEMIR, BIRTANE, KOKINO, 2001). Outra explicação que corrobora a anterior é que a FLBP inibiria a enzima cicloxigenase, especialmente a COX-2 importante no processo de produção de PGE₂ durante a instalação do processo inflamatório a partir do ácido aracídônico (ALMEIDA et al., 2011; ALMEIDA et al., 2013).

Conquanto as prostaglandinas sejam responsáveis pelo desenvolvimento de eventos vasculares associados à maior migração leucocitária na fase aguda da inflamação, o menor conteúdo de polimorfonucleares evidenciado em DFN e LST2 parece corroborar a hipótese de que a atividade anti-inflamatória estaria baseada no provável bloqueio da liberação local dessas aminas vasoativas, evidências já referendadas acima.

Outro achado digno de nota foi a verificação de vascularização aumentada na região retrodiscal, que muito embora tenha sido evidenciada no período de 24 horas para o DFN, foi marcadamente superior para LST2 no período de 24 horas e três dias, quando ambos foram comparados ao CRG. Esse fato pode estar relacionado a um incremento na reação de granulação, considerada a primeira etapa do processo de reparo pós-inflamação aguda (RIBEIRO et al., 2009a; RIBEIRO et al., 2009b; DANTAS et al., 2011).

Deve ser destacado que a instalação da reação de granulação depende fundamentalmente da cronificação da resposta inflamatória, uma vez que a neoformação vascular está associada à liberação de fatores de crescimento (ex. Fator de crescimento endotelial vascular-VEGF, Fator de crescimento derivado de plaquetas-PDGF) derivados de linfócitos e histiócitos, componentes reconhecidamente relacionados à inflamação crônica (KUMAR et al., 2010). Portanto, os maiores escores de vascularização observados em LST2 poderiam ser resultado de uma cronificação mais rápida da resposta inflamatória, confirmado pela presença de linfócitos e de histiócitos na periferia da área retrodiscal, somada à presença de vasos neoformados. Desta forma, pode-se inferir que o FLBP apresentou melhores resultados do que o DFN, representada pela sua ação anti-inflamatória mediada pela ação sobre a enzima cicloxigenase e as prostaglandinas, já discutidas, além da capacidade de reparo tecidual, verificada por intermédio do estímulo à proliferação endotelial e fibroblástica (PINHEIRO et al., 2003; KAMALI et al., 2007; GUERRA, 2009; RIBEIRO et al., 2009a; RIBEIRO et al., 2009b; DANTAS et al., 2011).

Esses achados validam o efeito positivo do tratamento com aplicações sucessivas para o tratamento das DTM's como indicado por diferentes autores (PINHEIRO et al., 1997; FIKÁCKOVÁ et al., 2007; MAZZETTO et al., 2007). Lembrando ainda que o FLBP apresenta efeito cumulativo com extensão dos seus resultados verificado em período posterior à conclusão do tratamento (SIMUNOVIC, 1996; PINHEIRO et al., 1997; PINHEIRO et al., 1998; KATO et al., 2006), que não pôde ser verificado nesse trabalho, visto que os animais foram eutanasiados em tempos específicos, não tendo sido prorrogada a avaliação com a suspensão do tratamento. Contudo, é uma característica extremamente positiva quando utilizada em humanos com DTM's especialmente as dolorosas.

É importante notar que em ambas as etapas do trabalho aqui descritas, a aplicação do laser obedeceu às mesmas características, ou seja, aplicação em apenas um único ponto, localizado na porção central da articulação do lado direito da face dos animais (CARVALHO et al., 2011).

Outro fato de importância foi a manutenção do contato da ponta do aparelho laser com a pele da área irradiada, que se justifica pelo fato de que agindo dessa maneira seria obtida máxima irradiação no tecido alvo, reduzindo a reflexão da luz e tendo como consequência o desenvolvimento de alta densidade de energia local com consequente potencialização do efeito da fototerapia (SIMUNOVIC, 1996; AHRARI et al., 2013).

Muito embora os resultados aqui divulgados atestem o FLBP como tendo efeito positivo no controle da sintomatologia algica, bem como, na redução do processo inflamatório, alguns autores sugerem que a FT não foi eficiente no atendimento a esses propósitos (TULLBERG, ALSTERGREN, ERNBERG, 2003; VENANCIO, CAMPARIS, LIZARELLI, 2005; KATO et al., 2006; EMSHOFF et al., 2008; SANDOVAL et al., 2009; KUCUK et al, 2010). Acredita-se, no entanto, que esses resultados negativos possam estar relacionados a problemas com os protocolos utilizados (TURNÉR, HODE, 1998; TURNÉR, HODE, 2010), lembrando que a resposta da LT está associada a vários fatores que se não bem considerados resultarão em respostas no mínimo dúbias a respeito da efetividade do tratamento com FLBP.

Ressalte-se que os resultados aqui apresentados reforçam a utilização da FLBP como auxiliar no tratamento das condições dolorosas e inflamatórias relacionadas à DTM, favorecendo o melhor manejo e melhora da qualidade de vida do paciente, além de propiciar meio favorável ao correto diagnóstico da causa da desordem e maior efetividade do tratamento da mesma. Entretanto, não descarta a necessidade do profissional em investigar de maneira efetiva a etiologia da desordem nessa articulação, descartando, por conseguinte, o retorno da

sintomatologia dolorosa e inflamatória na ATM (NÚÑEZ et al., 2006; ÇETINER, KAHRAMAN, YÜCETAŞ, 2007; MAZZETTO et al., 2007, DA SILVA et al., 2012; AHRARI et al., 2013).

Todavia, com base nos resultados obtidos nas condições experimentais propostas nessa pesquisa, novos experimentos no âmbito clínico deverão ser realizados para validar a FLBP no manejo das condições dolorosas e inflamatórias associadas às DTM, estabelecendo protocolos mais seguros e efetivos, que possam atender ao maior número de casos possíveis com resultados positivos.

7 CONCLUSÕES

Baseado nos resultados apresentados, bem como, nas condições experimentais utilizadas nesse trabalho, pôde-se concluir que:

- O protocolo utilizado no grupo LST2 ($52,5 \text{ J/cm}^2$) foi capaz de controlar a dor induzida na ATM de ratos, quando foi realizada a avaliação dos comportamentos individualmente e em associação;
- O protocolo utilizado no grupo LST3 ($87,5 \text{ J/cm}^2$) apresentou-se eficiente em reduzir a dor imediata quando os comportamentos de LC e de CO foram analisados em associação;
- O protocolo utilizado no grupo LST1 ($12,5 \text{ J/cm}^2$) não foi capaz de controlar a dor induzida pela injeção de formalina a 2,5%;
- Os grupos LST2 e DFN apresentaram efeito anti-inflamatório sobre a inflamação induzida na ATM dos ratos pela injeção de carragenina a 1%;
- O grupo LST2 mostrou-se mais eficiente do que o grupo DFN em promover o reparo tecidual após a inflamação induzida com carragenina a 1% na ATM de ratos.

8 PRODUÇÃO CIENTÍFICA

A doutoranda **Sandra Regina Barreto**, graduou-se em Odontologia no ano de 1993, na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Sergipe. Já durante a graduação teve a oportunidade de participar como bolsista de Iniciação científica em projeto financiado pelo CNPq e orientado pela **Profa. Dra. Sônia Maria Alves Novais**. Obtido o grau de Bacharel em Odontologia, seguiu para o Estado da Bahia onde iniciou em 1994 o seu mestrado em Odontologia na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia.

Durante o período da realização do mestrado houve uma vivência importante na área da docência, quando atuou como professora substituta nas disciplinas: Denística I e II por 02 anos, participando intensamente nas atividades junto aos alunos do curso, auxiliando na teoria, bem como, nas atividades práticas: laboratorial e ambulatorial. Iniciou também, a experiência em pesquisa laboratorial, com ênfase nas avaliações mecânicas de materiais dentários e preparos cavitários diretos, orientados pela **Profa. Dra. Rebeca Barroso Bezerra**; pesquisa essa financiada pela CAPES.

Finalizado o mestrado, já era contratada da Universidade Tiradentes/SE como professora efetiva junto às disciplinas: Dentística Laboratorial e Dentística Restauradora, onde atua até o presente momento. Nessa Instituição de ensino Superior pode iniciar seus trabalhos de orientações de alunos em finalização da graduação (TCC), bem como de iniciação científica, desenvolvendo projetos de pesquisa institucionalizados, com ênfase na avaliação de materiais dentários diretos e clareamento dental.

A oportunidade do doutorado surgiu em 2008, quando foram abertas as inscrições para a primeira turma de Doutorado em Ciências da Saúde, no núcleo de Pós-graduação em Medicina da Universidade Federal de Sergipe, com projeto apresentado com foco na área de Dor e Inflamação, com provável orientação do **Prof. Dr. Leonardo Rigoldi Bonjardim**, que se confirmou com a aprovação da aluna nos testes de submissão. Ressalte-se que toda a fase de elaboração do projeto foi de responsabilidade da doutoranda, que se valeu não de sua experiência no assunto, mas de sua imensa vontade de buscar novas linhas de pesquisa e, obviamente, de dar prosseguimento a sua pós-graduação. Contudo, na tentativa de fazer coincidir ao máximo possível a interação de linhas de pesquisa do orientador e da orientanda, além de torna-lo mais próximo possível da área de atuação da última, o projeto buscou foco

na utilização da FLBP no tratamento da dor na articulação temporomandibular de animais experimentais.

Confessasse que na experiência pregressa da doutoranda na área da pesquisa nunca houvera sido experimentado o manejo com animais, ou mesmo da utilização de fármacos ou outras terapias senão aquelas de atuação direta na resolução de dores comuns ao tratamento odontológico. Desta forma, houve a necessidade do treinamento das diferentes etapas do projeto, que incluiu: o manejo com animais, cálculo de drogas, indução inflamatória com diferentes agentes flogísticos, compreensão e utilização de terapia com laser com finalidade analgésica e anti-inflamatória, aprendizado da utilização de microscópios, balanças de precisão, além do treinamento com todos os aparelhos e técnicas relacionadas às avaliações histomorfológicas.

Da obrigatoriedade do treinamento com o laser surgiu a necessidade do engajamento da doutoranda em trabalhos afins junto a projetos elaborados e desenvolvidos no Laboratório de Morfologia e Biologia Estrutural (LMBE) do Instituto de Tecnologia e Pesquisa (ITP) localizado na Universidade Tiradentes, onde teve participação nas etapas experimentais do projeto. Surge dessa etapa a primeira publicação intitulada: **“Improvement of dermal burn healing by combining sodium alginate/chitosan-based films and low level laser therapy”**, tendo sido publicada na revista *Journal of Photochemistry and Photobiology B, Biology Qualis: B1-MEDICINA I* e fator de impacto: 2.814 (ANEXO B).

A Doutoranda também realizou treinamento referente às etapas envolvidas nas análises da atividade de mieloperoxidase, que aconteceram no Laboratório localizado no Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (UFS) sob responsabilidade da **Profa. Dra. Sara Maria Thomazzi**, e sob o auxílio e supervisão da até então doutoranda **Profa. Renata Ribeiro Marinho**. O objetivo dessa fase foi agregar ao máximo, conhecimentos sobre técnicas que pudessem auxiliar na obtenção das respostas às questões da pesquisa. Foi possível nessa fase aprender a manusear substâncias e equipamentos, além de conhecer a sequência técnica de todos os procedimentos relacionados. É importante ressaltar que os conhecimentos obtidos nessa fase serão aproveitados em etapa posterior, quando da padronização da remoção do tecido que será submetido à análise.

Do aprendizado sobre o manejo do laser, além do aprofundamento dos estudos sobre o assunto, implicou na necessidade de se repensar o projeto inicial e de alterar os protocolos que estavam sendo utilizados. Em consequência disso, surgiu a possibilidade de se trabalhar com avaliações nociceptivas da terapia com laser, o que implicou na necessidade do aprendizado sobre os testes nociceptivos, proposto nesse trabalho como inédito, uma vez que não existe na

literatura até o presente momento nenhuma publicação avaliando o efeito antinociceptivo da FLBP para a resolução imediata da dor. A resultante da alteração dos protocolos do Laser foi a necessidade da repetição dos ensaios histomorfológicos.

Como fruto desse trabalho que agora se encontra finalizado foi enviado para publicação o artigo intitulado: **“Evaluation of antinociceptive and anti-inflammatory activity of low-level laser therapy on TMJ inflammation in rodents.”**, com pretensão de ser publicado na revista: Journal of Photochemistry and Photobiology B, Biology, cujas especificações foram descritas acima (ANEXO C), para o comprimento de parte dos pré-requisitos exigidos para o doutoramento.

Finalizada a Pós-graduação em nível Doutorado, as pesquisas seguirão, inicialmente com a avaliação do PCR em tempo real dos mediadores inflamatórios envolvidos na inflamação na ATM de animais experimentais que já foi iniciada, com a obtenção dos *primers* a serem utilizados na pesquisa e cujos testes serão realizados em parceria com a EMBRAPA-SE. A outra proposta que começa a ser elaborada refere-se à possibilidade de continuar estreitando relações com o orientador do Doutorado, **Prof. Dr. Leonardo Rigoldi Bonjardim**, agora à distância, a fim de avaliar o caráter mediado pelo sistema nervoso central das respostas obtidas com a laserterapia, treinamento que será iniciado tão logo se caracterize como finalizado o Doutorado. Esses novos experimentos auxiliarão para maior envolvimento com a área e abrirão possibilidades para novos trabalhos, dentro dessas perspectivas, como por exemplo, auxiliando os pesquisadores iniciantes que pretendam trabalhar com avaliações nociceptivas ou mesmo em pesquisas que envolvam FLBP ou ATM em animais experimentais, desenvolvidas no laboratório dentro do qual realizei as minhas análises, qual seja: Laboratório de Biologia e Morfologia Estrutural (LBME/ITP), sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Jr.**

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, F.V; FRANKLIN, K.B.J; CONEL, B. The stress of a novel environment reduces formalin pain: possible role of serotonin. **Eur J Pharmacol**, v.60, p.126-141. 1986.
- ABBOTT, F. V.; FRANKLIN, K. B. J.; WESTBROOK, R. F. The formalin test: scoring properties of the first and second phases of the pain response in rats. **Pain**, v.60, n.1, p.91-102, jan. 1995.
- AHRARI, F.; MADANI, A. S.; GHAFOURI, Z. S.; TUNÉR, J. The efficacy of low-level laser therapy for the treatment of myogenous temporomandibular joint disorder. **Lasers Med Sci**, v.15, jan. 2013.[epub ahead of print].
- AIMBIRE, F.; ALBERTINI, R.; PACHECO, M.T.T.; CASTRO-FARIA-NETO, H.C.; LEONARDO, P.S.L.M.; IVERSEN, V.V.; LOPES-MARTINS, R.A.B.; BJORDAL, J.M.; Low-level laser therapy induces dose-dependent reduction of TNF levels in acute inflammation. **Photomed Laser Surg**, v.24, n.1, p.33-37, feb. 2006.
- ALLER, M. A.; ARIAS, J. L; ARIAS, J. I.; SÁNCHEZ-PATÁN, F.; ARIAS, J. The inflammatory response: An efficient way of life. **Medical Science Monitor**, v.12, n.10, p.225-234. 2006.
- ALLER, M. A.; ARIAS, J. L.; ARIAS, J. I.; SÁNCHEZ-PATÁN, F.; ARIAS, J. The inflammatory response recapitulates phylogeny through trophic mechanisms to the injured tissue. **Medical Hypotheses**, v.68, n.1, p.202–209. 2007.
- ALMEIDA, P. de; LOPES-MARTINS, R.A.B.; TOMAZONI, S.S.; ALBUQUERQUE-PONTES, G. M.; SANTOS, L. A.; VANIN, A. A.; FRIGO, L.; VIEIRA, R. P.; ALBERTINI, R.; CARVALHO, P. de T. C. de; LEAL-JUNIOR, E. C. P. Low-Level Laser therapy and sodium diclofenac in acute inflammatory response induced by skeletal muscle trauma: effects in muscle morphology and mRNA gene expression of inflammatory markers. **Photochem Photobiol**, v.89, n.2, p.501-507, mar. 2013.
- ALMEIDA, P. de; LOPES-MARTINS, R.A.B.; TOMAZONI, S.S.; SILVA Jr, J.A.; CARVALHO, P. de T. C. de; BJÖRDAL, J.M.; LEAL-JUNIOR, E. C. P. Low-level Laser therapy improves skeletal muscle performance, decreases skeletal muscle damage and modulates mRNA expression of COX-1 and COX-2 in a dose-dependent manner. **Photochem Photobiol**, v.87, n.5, p.1159-1163, sep-oct. 2011.
- ALWANI, M. E; WU, B. X.; OBEID, L. M.; HANNUN, Y. A. Bioactive sphingolipids in the modulation of the inflammatory response. **Pharmacol Ther**, v.112, n.1, p.171-183, oct. 2006.
- BAGIS, B.; AYAZ, E. A.; TURGUT, S.; DURKAN, R.; ÖZCAN, M. Gender difference in prevalence of signs and symptoms of temporoman-dibular joint disorders: a retrospective study on 243 consecutive patients. **Int J Med Sci**, v.9, n.7, p.539-544. 2012.

BARBERIS, G.; GAMRON, S.; ACEVEDO, G.; CADILE, I.; JURI, H.; CAMPANA, V.; CASTEL, A.; ONETTI, C.M.; PALMA, J.A. In vitro release of prostaglandin E2 after Helium-Neon laser radiation from synovial tissue in osteoarthritis. **J Clin Laser Med Sur**; v.13, n.4, p. 263-265. 1995.

BARBERIS, G.; GAMRON, S.; ACEVEDO, G.; CADILE, I.; JURI, H.; CAMPANA, V.; CASTEL, A.; ONETTI, C.M.; PALMA, J.A. In vitro synthesis of prostaglandin E2 by synovial tissue after Helium-Neon laser radiation in rheumatoid arthritis. **J Clin Laser Med Sur**; v.14, n.4, p. 175-177. 1996.

BASFORD, J. R. Low-intensity laser therapy: still not an established clinical tool. **Lasers Surg Med**, v.16, n.4, p.331-342, 1995.

BENEDICENTI, S.; PEPE, I. M.; ANGIERO, F.; BENEDICENTI, A. Intracellular ATP level increases in lymphocytes irradiated with infrared laser light of wavelength 904 nm. **Photomed Laser Surg**, v.26, n.5, p.451-453, oct. 2008.

BJÖRDAL, J.M; COUPPÉ, C.; CHOW, R. T; TUNÉR, J.; LJUNGGREN, E. A.A Systematic review of low level laser therapy with location-specific doses for pain from chronic joint disorders. **Aust J Physiother**, v.49, n.2, p.107-116. 2003.

BONJARDIM, L.R.; GAVIÃO, M.B. D.; PEREIRA, L.J.; CASTELO, P. M.; GARCIA, R.C. M. R.. Signs and symptoms of temporomandibular disorders in adolescentes. **Braz Oral Res**, v.19 ,n.2, p.93-98. 2005.

BONJARDIM, L. R.; LOPES-FILHO, R.J.; AMADO, G.; ALBUQUERQUE, R.L.Jr.; GONÇALVES, S.R. Association between symptoms of temporomandibular disorders and gender, morphological occlusion, and psychological factors in a group of university students. **Indian J Dent Res**, v.20, n.2, p.190-1924, apr-jun. 2009.

BONJARDIM, L.R.; SILVA, A.P. da; GAMEIRO, G.H.; TAMBELI, C.H.; VEIGA, M.C.F. de A. Nociceptive behavior induced by mustard oil injection into the temporomandibular joint is blocked by a peripheral non-opioid analgesic and a central opioid analgesic. **Pharmacol Biochem Behav**, v.91, n.3, p. 321-6, jan. 2009; Epub 2008, Aug-8.

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

CAPUANO, A.; DE CORATO, A.; TREGLIA, M.; TRINGALI, G.; RUSSO, C.D.; NAVARRA, P. Antinociceptive activity of buprenorphine and lumiracoxib in the rat orofacial formalin test: A combination analysis study. **Eur J Pharmacol**, v.605, n. 1-3, p. 57-62, mar. 2009.

CARVALHO, C.M.; LACERDA, J. A. de; SANTOS NETO, F. P. dos; CANGUSSU, M.C.T.; MARQUES, A.M.C.; PINHEIRO, A.L.B. Wavelength effect in temporomandibular joint pain: a clinical experience. **Lasers Med Sci**, v.25, n.2, p.229-232, mar. 2010.

CARVALHO, C. M.; LACERDA, J. A.; SANTOS NETO, F. P. dos; CASTRO, I. C. V. de; RAMOS, T. A.; LIMA, F. O. de; LUZ, J.G. de C.; RAMALHO, M. J. P.; SANTOS, J. N. dos;

PINHEIRO, A. L. B. Evaluation of Laser Phototherapy in the inflammatory process of the rat's TMJ Induced by carrageenan. **Photomed Laser Surg**, v.29, n.4, p.245-254, apr. 2011.

CARVALHO, H.F., RECCO-PIMENTEL, S.M. **A Célula**. 1ed. Editora Manole Ltda-São Paulo, p. 217-227, 2001.

CASSIM, B.; NAIDOO, S.; RAMSAROOP, R.; BHOOJA, K.D. Immunolocalization of bradykinin receptors on human synovial tissue. **Immunopharmacology**, v.36, n.2-3, p.121-125, jun. 1997.

CASTARDO, J.C. **Avaliação da atividade do extrato hidroalcoólico bruto da *Garcinia Gardneriana* (planchon & triana) Zappi em modelos experimentais de inflamação aguda em camundongos**. Curitiba, PR, 2007. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Departamento de Farmacologia do Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná. 137 pgs.

ÇETINER, S.; KAHRAMAN, S. A.; YÜCETAŞ, S. Evaluation of low-level laser therapy in the treatment of temporomandibular disorders. **Photomed Laser Surg**, v.24, n.5, p.637-641, oct. 2007.

CHICHORRO, J. G.; LORENZETTI, B.B.; ZAMPRONIO, A. R. Involvement of bradykinin, cytokines, sympathetic amines and prostaglandins in formalin-induced orofacial nociception in rats. **British Journal of Pharmacology**, v.141, n.7, p. 1175–1184, mar. 2004.

CLARK, R.A. Wound repair - overview and general considerations, in: _____. **The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair**. New York: Plenum Press, 1996. pp. 3–50.

CLAVELOU, P.; DALLEL, R.; ORLIAGUET, T.; WODA, A.; RABOISSON, P. The orofacial formalin test in rats: effects of different formalin concentrations. **Pain**, v.62, n.3, p. 295-301, sep.1995.

CLAVELOU, P.; PAJOT, J.; DALLEL, R.; RABOISSON, P. Application of the formalin test to the study of orofacial pain in the rat. **NeurosciLett**, v.103, n.3, p.349-353, sep. 1989.

CONTI, P.C.R.; VALLE, A.L. do; SCOLARO, J.M. Alterações degenerativas da articulação temporomandibular. Conceitos relacionados à etiologia e controle. **JBA**, v.1, n.4, p.308-313, out-dez. 2001.

CUNHA, T. M.; VERRI J.R.; WALDICEU, A.; SCHIVO, I. R.; NAPIMOOGA, M. H.; PARADA, C. A.; POOLE, S.; TEIXEIRA, M. M.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. **J lekoc Biol**, v.83, n.4. p.824-832, apr. 2008.

DA SILVA, M. A. M. R.; BOTELHO, A. L.; TURIM, C.V.; DA SILVA, A. M. B. R. Low level laser therapy as na adjunctive technique in the management of temporomandibular disorders. **Cranio**, v.30, n.4, p.264-271, oct. 2012.

DALLEL, R.; RABOISSON, P.; CLAVELOU, P.; SAADE, M.; WODA, A. Evidence for a peripheral origin of the tonic nociceptive response to subcutaneous formalin. **Pain**, v.61, n.1, p.11-16, apr. 1995.

DANTAS, M.D.M.; CAVALCANTE, D.R.R.; ARAÚJO, F.E.N.; BARRETTO, S.R.; ACIOLE, G.T.S.; PINHEIRO, A.L.B.; RIBEIRO, M.A.G.; LIMA-VERDE, I.B.; MELO, C.M.; CARDOSO, J.C.; ALBUQUERQUE Jr., R.L.C. Improvement of dermal burn healing by combining sodium alginate/chitosan-based films and low level laser therapy. **J Photochem Photobiol B**, v.105, n.1, p.51-59, oct. 2011.

DE BEM, D. M.; MACIEL, C. D.; ZUANON, J. A.; NETO, C. B. Histological analysis of healthy epithelium of Wistar rats in vivo irradiated with different intensities of therapeutic ultrasound. **Rev Bras Fisioter**, v.14, n.2, p. 114-20. 2010.

DE LEEUW, R. Disfunção temporomandibular. In: DE LEEUW, R. **Dor Orofacial: Guia de avaliação, Diagnóstico e Tratamento**. 4^a ed. Quintessence Editora-São Paulo, p.129-204. 2010. 315 pgs.

DETAMORE, M.S.; HEGDE, J.N.; WAGLE, R.R.; ALMARZA, A.J.; MONTUFAR-SOLIS, D.; DUKE, P.J.; ATHANASIOU, K.A. Cell Type and distribution in the porcine temporomandibular joint disc. **J Oral Maxillofac Surg**, v.64, n.2, p.243-248, feb. 2006.

DETAMORE, M.S.; ORFANOS, J.G.; ALMARZA, A.J.; FRENCH, M.M.; WONG, M.E.; ATHANASIOU, K.A. Quantitative analysis and comparative regional investigation of the extracellular matrix of the porcine temporomandibular joint disc. **Matrix Biol**, v.24, n.1, p.45-47, feb. 2005.

DIATCHENKO, L.; SLADE, G.D.; NACKLEY, A.G.; BHALANG, K.; SIGURDSSON, A.; BELFER, I.; GOLDMAN, D.; XU, K.; SHABALINA, S.A.; SHAGIN, D.; MAX, M.B.; MAKAROV, S.S.; MAIXNER, W. Genetic basis for individual variations in pain perception and the development of a chronic pain condition. **Hum Mol Genet**, v.14, n.1, p.135-143, jan. 2005.

DIEGELMANN, R.F.; EVANS, M.C. Wound healing: An overview of acute, fibrotic and delayed healing. **Front Biosci**, v.9, p.283-9, 2004.

DI ROSA, M. Biological properties of carrageenan. **J. Pharm Pharmac**, v.24, n.2, p.89-102, feb. 1972.

DOSTALOVÁ, T.; HLINAKOVA, P.; KASPAROVA, M.; REHACEK, A.; VAVRICKOVA, L.; NAVRÁTIL, L. Effectiveness of physiotherapy and GaAlAs laser in the management of temporomandibular joint disorders. **Photomed Laser Surg**, v.30, n.5, p. 275-280, may. 2012.

DRAY, A. Inflammatory mediators of pain. **Brit J Anaesth**, v.75, n.2, p.125-131, aug. 1995.

DREIER, R.; GRÄSSEL, S.; FUCHS, S.; SCHAUMBURGER, J.; BRUCKNER, P. Pro-MMP-9 is a specific macrophage product and is activated by osteoarthritic chondrocytes via MMP-3 or a MT1-MMP/MMP-13 cascade. **Exp Cell Res**, v.297, n.2, p.303-312, jul(15). 2004.

DUBUISSON, D.; DENNIS, S. G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain**, v.4, n.2, p. 161-174, dec. 1977.

DWORKIN, S.F.; HUGGINS, H.K.; LeRESCHE, L.; VON KORFF, J.; TRUELOVE, E.; SOMMERS, E. Epidemiology of signs and symptoms in temporomandibular disorders: clinical signs in cases and controls. **J Am Dent Assoc**, v.120, p.273-81. 1990.

ELLMAN, M.B; YAN, D.; AHMADINIA, K.; CHEN, D.; AN, H.S.; IM, H.J. Fibroblast Growth Factor Control of Cartilage Homeostasis. **J Cell Biochem**, v.114, n.4, p. 735-742, apr. 2013.

EMSHOFF, R.; BÖSCH, R.; PÜMPEL, E.; SCHÖNING, H.; STROBL, H. Low-level laser therapy for treatment of temporomandibular joint pain: a double-blind and placebo-controlled trial. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.105, n. 4, p. 452-6, Apr. 2008.

FERREIRA, D.M.; ZÂNGARO, R.A.; VILLAVERDE, A. B.; CURY, Y.; FRIGO, L.; PICOLO, G.; LONGO, I.; BARBOSA, D.G. Analgesic effect of He-Ne (632.8 nm) low-level laser therapy on acute inflammatory pain. **Photomed Laser Surg**, v.23, n.2, p.177-181, apr. 2005.

FIKÁCKOVÁ, H.; DOSTÁLOVÁ, T.; NAVRÁTIL, L.; KLASCHKA, J. Effectiveness of Low-Level Laser Therapy in Temporomandibular Joint Disorders: A Placebo-Controlled Study. **Photomed Laser Surg**, v.25, n.4, p.297-303, aug. 2007.

FLOWER, R.J.; PERRETTI, M. Controlling inflammation: a fat chance? **J Exp Med**, v.201, n.5, p.671-674, mar. 2005.

FRICTON, J.R. The relationship of temporomandibular disorders and fibromyalgia: Implications for diagnosis and treatment. **Curr Pain Headache Rep**, v. 8, n.5, p.355-63, oct. 2004.

FRIED, K.; BONGENHIEL, M.U.; BOISSONADE, F.M.; ROBINSON, P.P. Nerve injury-induced pain in the trigeminal system. **Neuroscientist**, v.7, n.2, p.155-165, Apr. 2001.

GENOVESE, W.J. **Laser de Baixa Intensidade: Aplicações terapêuticas em Odontologia**. 1^a ed. Livraria e Editora Santos: São Paulo. Cap.7. p:102-105. 2007.

GONÇALVES, D.A.; DAL FABBRO, A.L.; CAMPOS, J.A.; BIGAL, M.E.; SPECIALI, J.G. Symptoms of Temporomandibular Disorders in the Population: An Epidemiological Study. **J Orofac Pain**, v.24, n.3, p.270-278, Summer. 2010.

GOTZSCHE, P.C. Non-steroidal anti-inflammatory drugs. **BMJ**, v.320, p.1063-1070. 2000.

GOULART, A.C.; CORREIA, F. A. dos S.; SOUSA, S. C. O. M. de; LUZ, J. G. de C. Study of the inflammatory process induced by injection of carrageenan or formalin in the rat temporomandibular joint. **Braz Oral Res**, v.19, n.2, p.99-105, apr/jun. 2005.

GRAY, R.J.; DAVIES, S.J.; QUAYLE, A.A. A clinical approach to temporomandibular disorders. 1. Classification and functional anatomy. **Br Dent J**, v.176, n.11, p.429-435, jun. 1994.

GUALILLO, O.; EIRAS, S.; LAGO, F.; DIÉGUEZ, C.; CASANUEVA, F. F. Elevated serum leptin concentrations induced by experimental acute inflammation. **Life Sci**, v.67, n.20, p.2433-2441, oct. 2000.

GUARDA-NARDINI, L.; PICCOTTI, F.; MOGNO, G.; FAVERO, L.; MANFREDINI, D. Age-related differences in temporomandibular disorder diagnoses. **Cranio**, v.30, n.2, p.103-9, apr. 2012.

GUERRA, F. da R. **Avaliação morfológica e bioquímica do disco articular da ATM de ratos submetidos à terapia com laser de baixa potência: estudo experimental em animais portadores de disfunção temporomandibular**. Campinas-SP, 2009. 92p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural). Instituto de Biologia, Universidade estadual de campinas.

HAAS, D. A.; NAKAN-SHI, O.; MACMILLAN, R. E.; JORDAN, R. C.; HU, J. W. Development of an orofacial model of acute inflammation in the rat. **Archs oral Bid.**; v.37, n.5, p. 417-422. 1992.

HARGREAVES, K.M. Orofacial pain. **Pain**, v.152, suppl. 3, p.S25-32, mar. 2011.

HILL, H.E; BELLEVILLE, R.E; WIKLER, A. Studies on anxiety associated with anticipation of pain. II. Comparative effects of pentobarbital and morphine., **AMA Arch Neurol Psychiatry**, v.73, n.6, p.602-608, Jun. 1955.

HU, J.W. Response properties of nociceptive and non-nociceptive neurons in the rat's trigeminal subnucleus caudalis (medullary dorsal horn) related to cutaneous and deep craniofacial afferent stimulation and modulation by diffuse noxious inhibitory controls. **Pain**, v.41, n.3, p.331-345, jun. 1990.

HUANG, Q.; OPSTELTEN, D.; SAMMAN, N.; TIDEMAN, H. Experimentally induced unilateral tooth loss: expression of type II collagen in temporomandibular joint cartilage. **J Oral Maxillofac Surg**, v.61, n.9, p.1054-1060, sep. 2003.

ISHIMARU, J.-I.; OGI, N.; MIZUI, T.; MIYAMOTO, K.; SHIBATA, T.; KURITA, K. Effects of a single arthrocentesis and a COX-2 inhibitor on disorders of temporomandibular joints. A preliminary clinical study. **Br J Oral Maxillofac Surg**, v.41, n.5, p.323-328, oct. 2003.

KAMALI, F.; BAYAT, M.; TORKAMAN, G.; EBRAHIMI, E.; SALAVATI, M. The therapeutic effect of low-level laser on repair of osteochondral defects in rabbit knee. **J Photochem Photobiol B**, 27; v.88, n.1, p.11-5, Jul. 2007. Epub 2007 may 1.

KANEYAMA, K.; SEGAMI, N.; NISHIMURA, M.; SATO, J.; FUJIMURA, K.; YOSHIMURA, H. The ideal lavage volume for removing bradykinin, interleukin-6, and protein from the temporomandibular joint by arthrocentesis. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 62, n.6, p. 657-661, jun. 2004.

KARU T. I.; KOLYAKOV S. F. Exact action spectra for cellular responses relevant to phototherapy. **Photomed Laser Surg**, v.23, n.4, p.355-361, aug. 2005.

KARU, T. I. Mitochondrial Mechanisms of Photobiomodulationin Context of New Data About Multiple Roles of ATP. **Photomed Laser Surg**, v.28, n.2, p. 159-161, apr. 2010a.

KARU, T. I. Multiple Roles of Cytochromec Oxidase in Mammalian Cells Under Action of Red and IR-A Radiation. **Life**, v.62, n.8, p. 607-610, aug. 2010b.

KARU, T. I.; PYATIBRAT, L. V.; KOLYAKOV, S. F.; AFANASYEVA, N. I. Absorption Measurements of Cell Monolayers Relevant to Mechanisms of Laser Phototherapy: Reduction or Oxidation of Cytochrome c Oxidase Under Laser Radiation at 632.8 nm. **Photomed Laser Surg**, v.26, n.6, p.593-599, dec. 2008.

KATO, M.T.; KOGAWA, E.M.; SANTOS, C.N.; CONTI, P.C.R. Tens and low-level laser therapy in the management of temporomandibular disorders. **J Appl Oral Sci**, v.14, n.2, p.130-5, apr. 2006.

KOGAWA, E. M.; CALDERON, P. S.; LAURIS, J. R. P. C.; ARAUJO, R. P.; CONTI, P. C. R. Evaluation of maximal bite force in temporomandibular disorders patients. **J Oral Rehabil**, v.33, n.8, p.559-565, aug. 2006.

KOJIMA, F.; NARABA, H.; SASAKI, Y.; BEPPU, M.; AOKI, H.; KAWAI, S. Prostaglandin E2Is an enhancer of interleukin-1-induced expression of membrane-associated prostaglandin e synthase in rheumatoid synovial fibroblasts. **Arthritis Rheum**, v.48, n.10, p.2819-2128, oct. 2003.

KOLÁROVÁ, H.; DITRICOVÁ, D.; WAGNER, J. Penetration of the laser light into the skin in vitro. **Lasers Surg Med**, V.24, n.3, p.231-5. 1999.

KUCUK, Burcu. B.; ORAL, K.; SELCUK, N. A.; TOKLU, T.; CIVI, O. G. The anti-inflammatory effect of low-level laser therapy on experimentally induced inflammation of rabbit temporomandibular joint retrodiscal tissues. **J Orofac Pain**, v.24, n.3, p.293-297, summer. 2010.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; ASTER, J. C. Cap. Inflamação Aguda e crônica. In. _____. Robbins e Cotran. **Patologia-Bases Patológicas das Doenças**. 8^a Ed. Editora Elsevier:Rio de Janeiro. p.43-79. 2010. 1458pgs.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S.W. Animal models of nociception. **Pharmacol Rev**, v.53, n.4, p.597-652. 2001.

LEONARDI, R.; LO MUZIO, L.; BERNASCONI, G.; CALTABIANO, C.; PIACENTINI, C.; CALTABIANO, M. Expression of vascular endothelial growth fator in human dysfunctional temporomandibular joint discs. **Arch Oral Biol**, v.48, n.3, p.185-192, mar. 2003.

LERESCHE, L.; SAUNDERS, K.; VON KORFF, M. R.; BARLOW, W.; DWORAKIN, S. F. Use of exogenous hormones and risk of temporomandibular disorder pain. **Pain**, v.69, n.1-2, p.153-160, jan. 1997.

LIU, Z. J.; YAMAGATA, K.; KASAHARA, Y.; ITO, G. Electromyographic examination of jaw muscles in relation to symptoms and occlusion of patients with temporomandibular joint disorders. **J Oral Rehabil**, v26, n.1, p.33-47, jan. 1999.

LOBBEZOO, F.; DRANGSHOLT, M.; PECK, C.; SATO, H.; KOPP, S.; SVENSSON, P. Topical review: new insights into the pathology and diagnosis of disorders of the temporomandibular joint. **J Orofac Pain**, v.18, n.3, p.181-191, summer. 2004.

MA, K.; YIQUN, M.; WU, T.; WANG, W.; XIAOMING, L.; XIAOHUI, H.; YINGWEI, W. Efficacy of Diclofenac Sodium in Pain Relief after Conventional Radiofrequency Denervation for Chronic Facet Joint Pain: A Double-Blind Randomized Controlled Trial. **Pain Med**, v.12, n.1, p.27-35, jan. 2011.

MAIA, M.L.M.; BONJARDIM, L.R.; QUINTANS, J.S.S.; RIBEIRO, M.A.G.; MAIA, L.G.M.; CONTI, P.C.R. effect of low-level laser therapy on pain levels in patients with temporomandibular disorders: a systematic review. **J Appl Oral Sci**, v.20, n.6, p.594-602, nov-dec. 2012.

MANDELBAUM, S.R.; DI SANTIS, E.P.; MANDELBAUM, M.H.S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares -Parte I. **An Bras Dermatol**, v.78, n.4, p.393-410, jul./ago. 2003.

MAYDANA, A V.; TESCH, R. de S.; DENARDIN, O.V P.; URSI, W.J. da S.; DWORKIN, S.F. Possíveis fatores etiológicos para desordens temporomandibulares de origem articular com implicações para diagnóstico e tratamento. **Dental Press J Orthod**, v.15, n.3, p.78-86, may-jun. 2010.

MAZZARI, S.; CANELLA, R.; PETRELLI, L.; MARCOLONGO, G.; LEON, A. N-(2-Hydroxyethyl) hexadecanamide is orally active in reducing edema formation and inflammatory hyperalgesia by down-modulating mast cell activation. **Eur J Pharmacol**, v.300, n.3, p.227-236, apr. 1996.

MAZZETTO, M.O.; CARRASCO, T.G.; BIDINELO, E.F.; PIZZO, R.C. de A.; MAZZETTO, R.G. Low intensity laser application in temporomandibular disorders: a phase I double-blind study. **Cranio**, v.25, n.3, p.186-192, jul. 2007.

MAZZETTO, M. O.; HOTTA, T. H.; PIZZO, R. C. de A. Measurements of Jaw Movements and TMJ Pain Intensity in Patients Treated with GaAlAs Laser. **Braz Dent J**, v.21, n.4, p.356-360. 2010.

MIRANDA, H.F.; SIERRALTA, F.; PRIETO, J.C. Synergism between NSAIDs in the orofacial formalin test in mice. **Pharmacol Biochem Behav**; v.92, n.2, p.314–318, apr. 2009.

MISIEWICZ, B.; GRIEBLER, C.; GOMEZ, M.; RAYBOURNE, R.; ZELAZOWSKA, E.; GOLD, P.W.; STERNBERG, E. M. The estrogen antagonist tamoxifjzn inhibits carrageenan induced inflammation in Lew/N female rats. **Life Sci**, v.58, n.16, p. 281-286. 1996.

MIZOGUCHI, I.; TAKAHASHI, I.; NAKAMURA, M.; SASANO, Y.; SATO, S.; KAGAYAMA, M.; MITANI, H. An immunohistochemical study of regional differences

in the distribution of type I and type II collagens in rat mandibular condylar cartilage. **Arc Oral Biol**, v.41, n.8-9, p.863-869, aug-sep. 1996.

MIZUTANI, K.; MUSYA, Y.; WAKAE, K.; KOBAYASHI, T.; TOBE, M.; TAIRA, K.; HARADA, T. A clinical study on serum prostaglandin E2 with low-level laser therapy. **Photomed Laser Surg**, v.22, n.6, p.537-539, dec. 2004.

MONACO, J.A.L.; LAWRENCE, T. Acute wound healing: An review. **Clin Plastic Surg**, v.30, p.1-12. 2003

NAPIMOOGA, M.H.; SOUZA, G.R.; CUNHA, T.M.; FERRARI, L.F.; CLEMENTE-NAPIMOOGA, J.T.; PARADA, C.A.; VERRI, W.A.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. 15d-Prostaglandin J₂ inhibits inflammatory hypernociception: involvement of peripheral opioid receptor. **J Pharmacol Exp Ther**, v.324, n.1, p.313-321, jan. 2008.

NAUJOKS, C.; MEYER, U.; WIESMANN, H-P.; JÄSCHE-MEYER, J.; HOHOFF, A.; DEPPRICH, R.; HANDSCHEL, J. Principles of cartilage tissue engineering in TMJ reconstruction. **Head Face Med**, v.4:3, feb (25). 2008.

NOMURA, K.; VITTI, M.; OLIVEIRA, A.S. de; CHAVES, T. C.; SEMPRINI, M.; SIÉSSERE, S.; HALLAK, J.E.C.; REGALO, S.C.H. Use of the Fonseca's Questionnaire to Assess the Prevalence and Severity of Temporomandibular Disorders in Brazilian Dental Undergraduates. **Braz Dent J**, v.18, n.2, p.163-167. 2007.

NÚÑEZ, S.C.; GARCEZ, A.S.; SUZUKI, S.S.; RIBEIRO, M.S. Management of mouth opening in patients with temporomandibular disorders through low-level laser therapy and transcutaneous electrical neural stimulation. **Photomed Laser Surg**, v.24, n.1, p.45-49, feb. 2006.

OGURA, N.; SATOH, K.; AKUTSU, M.; TOBE, M.; KUYAMA, K.; KUBOYAMA, N.; SAKAMAKI, H.; KUJIRAKI, H.; KONDOH, T. MCP-1 production in temporomandibular joint inflammation. **J Dent Res**, v.89, n.10, p.1117-1122, oct. 2010.

OZDEMIR, F.; BIRTANE, M.; KOKINO, S. The Clinical Efficacy of Low-Power Laser Therapy on Pain and Function in Cervical Osteoarthritis. **Clin Rheumatol**, v.20, n.3, p.181-184. 2001.

PADI, S.S.V.; NAIDU, P.S.; KULKARNI, S.K. Involvement of peripheral prostaglandins in formalin-induced nociceptive behaviours in the orofacial area of rats. **Inflammopharmacology**, v.14, n.1-2, p.57-61, mar. 2006.

PAEGLE, D.I.; HOLMLUND, A.B.; REINHOLT, F.P. characterization of tissue components in the temporomandibular joint disc and posterior disc attachment region: internal derangement and control autopsy specimens compared by morphometry. **J Oral Maxillofac Surg**, v.60, n.9, p.1032-1037, sep. 2002.

PALLOTTA, R.C.; BJÖRDAL, J.M.; FRIGO, L.; LEAL JUNIOR, E.C.P.; TEIXEIRA, S.; MARCOS, R.L.; RAMOS, L.; MESSIAS, F. de M.; LOPES-MARTINS, R.A.B. Infrared (810-nm) low-level laser therapy on rat experimental knee inflammation. **Lasers Med Sci**, v.27, n.1, p.71-78, jan. 2012.

- PARKER, S. Low-level laser use in dentistry. **Brit Dent J**, v.202, n.3, p.131-138, feb. 2007.
- PESTILI DE ALMEIDA, E.M.; PICHÉ, C.; SIROIS, J.; DORÉ, M. Expression of cyclooxygenase-2 in naturally occurring squamous cell carcinomas in dogs. **J Histochem Cytochem**, v.49, n.7, p867-875, jul. 2001.
- PETER-SZABO, M.; KEKESI, G.; NAGY, E.; SZIVER, E.; BENEDEK, G.; HORVATH, G. Quantitative characterization of a repeated acute joint inflammation model in rats. **Clin Exp Pharmacol P**, v.34, n.5-6, p.520-526, may-Jun. 2007.
- PINHEIRO, A.L.B.; BRUGNERA Jr., A.; ZANIN, F.A.A. Aplicação do Laser na Odontologia. 1^a ed. Livraria e Editora Santos-São Paulo. 2010. 436 pgs.
- PINHEIRO, A. L. B.; CAVALCANTI, E. T.; PINHEIRO, T. I. T. N. R; ALVES, M. J. P. C.; MIRANDA, E. R.; QUEVEDO, A. S. de; MANZI, C. T. A.; VIEIRA, A. L. B.; ROLIM, A. B. Low-level laser therapy is an important tool to treat disorders of the maxillofacial region. **J Clin Laser Med Surg**, v.16, n.4, p.223-226, aug. 1998.
- PINHEIRO, A.L.B.; CAVALCANTI, E.T.; PINHEIRO, T.I.T.N.R.; ALVES, M.J.P.C.; MANZI, C.T.A. Low-level laser therapy in the management of disorders of the maxillofacial region. **J Clin Laser Med Surg**, v.15, n.4, p.181-183. 1997.
- PINHEIRO, A.L.B.; LIMEIRA JÚNIOR, F.A.; GERBI, M.E.M.; RAMALHO, L.M.P.; MARZOLA, C.; PONZI, E.A.C. Effect of low level laser therapy on the repair of bone defects grafted with inorganic bovine bone. **Braz Dent J**, v.14, n.3, p.177-181. 2003.
- POON, V.K.; HUANG, L.; BURD, A. Biostimulation of dermal fibroblast by sublethal Q-switched Nd:YAG 532 nm laser: Collagen remodeling and pigmentation. **J Photochem Photobiol B Biol**, v.81, n.1, p.1-8, oct. 2005.
- PORTO, G.G.; VASCONCELOS, B.C.G.; ANDRADE, E.S.de S.; SILVA-JÚNIOR, V.A. Comparison between human and rat TMJ: anatomic and histopathologic features. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.25, n.3, p.290-293. 2010.
- RABOISSON, P.; DALLET, R. The oral facial formalin test. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.28, n.2, p.:219-226, apr. 2004.
- RACICH, M.J. Orofacial pain and occlusion: Is there a link? An overview of current concepts and the clinical implications. **J Prosthet Dent**, v.93, n.2, p.189-196, feb. 2005.
- REHER, P.; TEIXEIRA, L.M.S. Articulação temporomandibular. In: TEIXEIRA, L.M.S.; REHER, P.; REHER, V.G.S. **Anatomia aplicada à Odontologia**. 1^a ed. Editora Guanabara Koogan: Rio de Janeiro. Cap. 8. p.109-120. 2001.
- REN, K.; DUBNER, R. The role of trigeminal interpolaris-caudalis transition zone in persistent orofacial pain. **Int Rev Neurobiol**, v.97, p.207-25. 2011.
- RIBEIRO, M. A. G.; ALBUQUERQUE Jr., R. L. C.; BARRETO, A. L. S.; MORENO, V. G. O.; SANTOS, T. B.; DANTAS, C. D. F. Morphological analysis of second-intention wound

healing in rats submitted to 16 J/cm² 2 e 660-nm laser irradiation. **Indian J Dent Res**, v.20, n.3, p. 390, jul-set. 2009a.

RIBEIRO, M. A. G.; ALBUQUERQUE Jr., R. L. C.; RAMALHO, L. M. P.; PINHEIRO, A. L. B. P.; BONJARDIM, L. R.; DA CUNHA, S. S. Immunohistochemical assessment of myofibroblasts and lymphoid cells during wound healing in rats subjected to laser photobiomodulation at 660 nm. **Photomed Laser Surg**, v.27, n.1, p.49-55, feb. 2009b.

RIOLO, M. L.; BRANDT, D.; TENHAVE, T.R. Associations between occlusal characteristics and signs and symptoms of TMJ dysfunction in children and young adults. **Am J Orthod Dentofac Orthop**, v.92, n.6, p.467-477, dec. 1987.

ROSLAND, J. H. The formalin test in mice: the influence of ambient temperature. **Pain**, v.45, n. 2, p. 211-216, may 1991.

ROSLAND, J.H.; TJØLSEN, A.; MAEHLE, B.; HOLE, K. The formalin test in mice: effect of formalin concentration. **Pain**, v.42, n.2, p.235-242. 1990.

ROVERONI, R.C.; PARADA, C.C.; VEIGA, M.C.F.A.; TAMBELI, C.H. Development of a behavioral model of TMJ pain in rats: the TMJ formalin test. **Pain**, v.94, n.2, p.185-91, nov. 2001.

SALMOS-BRITO, J.A.L.; MENEZES, R.F. de; TEIXEIRA, C.E.C.; GONZAGA, R.K.M.; RODRIGUES, B.H.M.; BRAZ, R.; BESSA-NOGUEIRA, R.V.; GERBI, M.E.M.M. Evaluation of low-level laser therapy in patients with acute and chronic temporomandibular disorders. **Lasers Med Sci**, v.28, n.1, p.57-64, jan. 2013.

SANDOVAL, M.C.; MATTIELLO-ROSA, S.M.G.; SOARES, E.G.; PARIZOTTO, N.A. Effects of laser on the synovial fluid in the inflammatory process of the knee joint of the rabbit. **Photomed Laser Surg**, v.27, n.1, p.63-69, feb. 2009.

SANTOS, T.S.; PIVA, M.R.; RIBEIRO, M.H.; ANTUNES, A.A.; MELO, A.R.; E SILVA, E.D.O. Lasertherapy efficacy in temporomandibular disorders: control study. **Braz J Otorhinolaryngol**, v.76, n.3, p.294-299. 2010.

SATOH, K.; OGURA, N.; AKUTSU, M.; KUBOYAMA, N.; KUYAMA, K.; YAMAMOTO, H.; KONDOH, T. Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in IL-1b-induced synovitis of the temporomandibular joint. **J Oral Pathol Med**, v.38, n.7, p.584-590, aug. 2009.

SCHAIBLE, H.G., EBERSBERGER, A; VON BANCHET, G.S. Mechanisms of pain in arthritis. **Ann. N.Y. Acad Sci**. v. 966, p.343-354. 2002.

SCHUMACHER, R.; VELDEN, M. Anxiety, pain experience, and pain report: a signal-detection study. **Percept Mot Skills**, v.58, n.2, p.339-349, apr. 1984.

SESSLE, B.J. Acute and chronic craniofacial pain: brainstem mechanisms of nociceptive transmission and neuroplasticity, and their clinical correlates. **Crit Rev Oral Biol Med**, v.11, n.1, p.57-91. 2000.

- SESSLE, B.J. Recent developments in pain research: central mechanisms of orofacial pain and its control. **J Endod.**, v.12, n.10, p.435-444, oct, 1986.
- SESSLE, B.J. Recent insights into brainstem mechanisms underlying craniofacial pain. **J Dent Educ.**, v.66, n.1, p.108-112, jan. 2002.
- SESSLE, B.J. The neural basis of temporomandibular joint and masticatory muscle pain. **J Orofac Pain**, v.13, n.4, p.238-245, fall. 1999.
- SESSLE, B.J. The neurobiology of facial and dental pain: present knowledge, future directions. **J Dent Res**, v.66, n.5, p.962-981, may, 1987.
- SHARAWY, M.; BHUSSRY, B.R.; SUAREZ, F.R. Articulação temporo-mandibular. In: BHASKAR e col. **Histologia e Embriologia Oral de Orban**. 10^a ed. Editora Artes Médicas: São Paulo. Cap. 13, p.427-437. 1989.
- SHERWOOD, E.R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Pract Res Clin Anaesthesiol**, v.18, n.3, p.385-405. 2004.
- SIMUNOVIC, Z. Low level laser therapy with trigger points technique: a clinical study on 243 patients. **J Clin Laser Med Surg**, v.14, n.4, p.163-167, aug. 1996.
- SONMEZ, H.; SARI, S.; OKSAK, Oray G.; CAMDEVIREN, H. Prevalence of temporomandibular dysfunction in Turk-ish children with mixed and permanent dentition. **J Oral Rehabil**, v.28, n.3, p.280-5, mar. 2001.
- SPEARS, R.; DEES, L.A.; SAPOZHNIKOV, M.; BELLINGER, L.L.; HUTCHINS, B. Temporal changes in inflammatory mediator concentrations in an adjuvant model of temporomandibular joint inflammation. **J Orofac Pain**, v.19, n.1, p.34-40, winter. 2005.
- SPIVAK, J. M.; GRANDE, D.A.; BEN-YISHAY, A.; MENCHE, D.S.; PITMAN, M.I. The effect of low-level Nd:YAG laser energy on adult articular cartilage in vitro. **Arthroscopy**, v.8, n.1, p.36-43. 1992.
- STRINGER, K.A.; BOSE, S.K.; MCCORD, J.M. Antiinflammatory activity of tissue plasminogen activator in the carrageenan rat footpad model. **Free Radic Biol Med**, v.22, n.6, p.985-988. 1997.
- SULEYMAN, H.; HALICI, Z.; HACIMUFTUOGLU, A.; GOCER, F. Role of adrenal gland hormones in antiinflammatory effect of calcium channel blockers. **Pharmacol Report**, v.58, n.5, p.692-699, sep-oct. 2006.
- TAKAHASHI, T.; KONDOH, T.; FUKUDA, M.; YAMAZAKI, Y.; TOYOSAKI, T.; SUZUKI, R. Proinflammatory cytokines detectable in synovial fluids from patients with temporomandibular disorders. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.85, n.2, p.135-141, feb. 1998.
- TING, E.; ROVERONI, R.C.; FERRARI, L.F.; LOTUFO, C.M.; VEIGA, M.C.; PARADA, C.A.; TAMBELI, C.H. Indirect mechanism of histamine-induced nociception in temporomandibular joint of rats. **Life Sci**, v.81, n.9, p.765-71, aug. 2007.

TJØLSEN, A.; BERGE, O-G.; HUNSKAAR, S.; ROSLAND, J. H.; HOLE., K. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, v.51, n.1, p.5-17. 1992.

TOMINAGA, K.; AISTERGREN, P.; KURITA, H.; MATSUKAWA, A.; FUKUDA, J.; KOPP, S. Interleukin-1 β in antigen-induced arthritis of the rabbit temporomandibular joint. **Arch Oral Biol**, v.46, n.6, p.539-544, jun. 2001.

TORRICELLI, P.; GIAVARESI, G.; FINI, M.; GUZZARDELLA, G. A.; MORRONE, G.; CARPI, A.; GIARDINO, R. Laser biostimulation of cartilage: in vitro evaluation. **Biomed Pharmacother**, v.55, n.2, p.117-20, mar. 2001.

TRAEBERT, J.; LACERDA, J.T.; FISCHER, T.K.; JINBO, Y. Dental Caries and Orofacial Pain Trends in 12-Year-Old School Children between 1997 and 2003. **Oral Health Prev Dent**, v.3, n.4, p.243-248. 2005.

TROELTZSCH, M.; TROELTZSCH, M.; CRONIN, R.J.; BRODINE, A.H.; FRANKENBERGER, R.; MESSLINGER, K. Prevalence and association of headaches, temporomandibular joint disorders, and occlusal interferences. **J Prosthet Dent**, v.105, n.6, p.410-417, jan. 2011.

TULLBERG, M.; ALSTERGREN, P.J.; ERNBERG, M.M. Effects of low-power laser exposure on masseter muscle pain and microcirculation. **Pain**, v.105, n.(1-2), p.89-96, sep. 2003.

TUNÉR, J.; HODE, L. Are all the negative studies really negative? **Laser Therapy**, v.10, p.165-174. 1998.

TUNÉR , J.; HODE, L. Low-level laser therapy for hand arthritis—fact or fiction? **Clin Rheumatol**, v.29, n.9, p.1075-1076, sep. 2010.

VANDERAS, A.P. Relationship between craniomandibular dysfunction and malocclusion in white children with and without unpleasant life events. **J Oral Rehabil**, v.21, n.2, p. 177-183, mar. 1994.

VENANCIO, R. de A.; CAMPARIS, C.M.; LIZARELLI, R. de F.Z. Low intensity laser therapy in the treatment of temporomandibular disorders: a double-blind study. **J Oral Rehabil**, v.32, n.11, p.800-807, nov. 2005.

VERGE, V.M.K.; XU, Z.; XU, X.J.; WIESENFELD-HALLIN, Z.; HÖKFELT, T. Marked increase in nitric oxide synthase mRNA in rat dorsal root ganglia after peripheral axotomy: In situ hybridization and functional studies. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.89, n.23, p.11617-11621, dec. 1992.

VIEROLA, A.; SUOMINEN, A.L.; IKÄVALKO, T.; LINTU, N.; LINDI, V.; LAKKA, H-M.; KELLOKOSKI, J.; NÄRHI, M.; LAKKA, T.A. Clinical signs of temporomandibular disorders and various pain conditions among children 6 to 8 years of age: the PANIC study. **J Orofac Pain**, v.26, n.1, p.17-25, winter. 2012.

VERRI, W.A. Jr; CUNHA, T.M.; PARADA, C.A.; POOLE, S.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development? **Pharmacol Ther**, v.112, n.1, p.116-138, oct. 2006.

WANG, X.D.; KOU, X.X; MAO, J.J; GAN, Y.H.; ZHOU, Y.H. Sustained inflammation induces degeneration of the temporomandibular joint. **J Den Res**, v.91, n.5, p.499-505, may. 2012.

WINTER, C.A.; RISLEY, E.A.; NUSS, G.W. Carrageenan-induced edema in hind paw of rats as an assay method for antiinflammatory drugs. **Proc Soc Exp Biol Med**, v.111, p.544-547, 1962.

YOSHIDA, H.; FUJITA, S.; NISHIDA, M.; IIZUKA, T. Immunohistochemical distribution of lymph capillaries and blood capillaries in the synovial membrane in cases of internal derangement of the temporomandibular joint. **J Oral Pathol Med**, v.26, n.8, p.356-361, sep. 1997.

ZEREDO, J.L.; SASAKI, K.M.; TAKEUCHI, Y.; TODA, K. Antinociceptive effect of Er:YAG laser irradiation in the orofacial formalin test. **Brain Res**, v.1032, n.1-2, p.149-153, jan-25. 2005.

ZUCCOLOTTO, M.C.C.; VITTI, M.; NÓBILO, K.A.; REGALO, S.C.H.; SIÉSSERE, S.; BATAGLION, C. Electromyographic evaluation of masseter and anterior temporalis muscles in rest position of edentulous patients with temporomandibular disorders, before and after using complete dentures with sliding plates. **Gerodontology**, v.24, n.2, p.105-10, jun. 2007.

APÊNDICE A: Ficha para acompanhamento da avaliação nociceptiva

APÊNDICE B-1: Ficha para acompanhamento da avaliação das etapas decorrentes da indução com carragenina

ANIMAIS	PESO ANTES DA INDUÇÃO	HORÁRIO DA INDUÇÃO	INDUÇÃO CARRAGENINA-ATM DIREITA	INDUÇÃO CARRAGENINA-ATM ESQUER.	ANIMAL VIÁVEL: SIM/NÃO	PESO APÓS A INDUÇÃO	HORÁRIO DO SACRIFÍCIO
SACRIFÍCIO 24 h: AZUL							
01							
02							
03							
05							
SACRIFÍCIO 03 dias: VERDE							
01							
02							
03							
04							
05							
SACRIFÍCIO 07 dias: PRETO							
01							
02							
03							
04							
05							

APÊNDICE B-2: Ficha para acompanhamento da avaliação das etapas decorrentes da indução com carragenina e tratamento com diclofenaco sódico

APÊNDICE B-3: Ficha para acompanhamento da avaliação das etapas decorrentes da indução com carragenina e tratamento com LST2

**ANEXO A: Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade
Tiradentes**

Parecer Consustanciado de Projeto de Pesquisa

Titulo do Projeto: Efeito do Laser de baixa potência sobre a resposta inflamatória experimentalmente induzida na articulação temporomandibular de ratos

Pesquisador Responsável Sandra Regina Barreto

Data da Versão 20/05/2009	Cadastro 030609	Data do Parecer 20/06/2009
----------------------------------	------------------------	-----------------------------------

Grupo e Área Temática	III - Projeto fora das áreas temáticas especiais
------------------------------	---

Itens Metodológicos e Éticos	Situação
Título	Adequado
Autores	Adequados
Local de Origem na Instituição	Adequado
Projeto elaborado por patrocinador	Não
Aprovação no país de origem	Não necessita
Local de Realização	Própria instituição
Outras instituições envolvidas	Não
Condições para realização	Adequadas

Pacientes e Métodos	
Delineamento	Adequado
Tamanho de amostra	Total 60 Local 60
Cálculo do tamanho da amostra	Adequado
Participantes pertencentes a grupos especiais	Não
Seleção equitativa dos indivíduos participantes	Não se aplica
Crítérios de inclusão e exclusão	Adequados
Relação risco- benefício	Não se aplica
Uso de placebo	Não utiliza
Período de suspensão de uso de drogas (wash out)	Não utiliza
Monitoramento da segurança e dados	Adequado
Avaliação dos dados	Adequada - quantitativa
Privacidade e confidencialidade	Não se aplica
Termo de Consentimento	Não se aplica
Adequação às Normas e Diretrizes	Sim

Comentários sobre os itens de Pacientes e Métodos

Cronograma	Adequado
Data de início prevista	
Data de término prevista	
Orçamento	Adequado
Fonte de financiamento externa	Não

Comentários sobre o Cronograma e o Orçamento

Cronograma adequado sugerindo duração de 12 meses após aprovação pelo CEP.

Referências Bibliográficas	Adequadas
-----------------------------------	------------------

Comentários sobre as Referências Bibliográficas

Recomendação

Aprovar

Comentários Gerais sobre o Projeto

Projeto de grande relevância para comunidade científica e comunidade de maneira geral, sendo considerado aprovado em relação a seus aspectos éticos.

Adriana Karta de Lima
Universidade Tiradentes - UNIT
Prof. Adriana Karta de Lima
Comitê de Ética em Pesquisa
Coordenadora

ANEXO B: ARTIGO PUBLICADO: “Improvement of dermal burn healing by combining sodium alginate/chitosan-based films and low level laser therapy”



Improvement of dermal burn healing by combining sodium alginate/chitosan-based films and low level laser therapy

M.D.M. Dantas^a, D.R.R. Cavalcante^a, F.E.N. Araújo^a, S.R. Barreto^a, G.T.S. Aciole^b, A.L.B. Pinheiro^b, M.A.G. Ribeiro^c, I.B. Lima-Verde^a, C.M. Melo^a, J.C. Cardoso^a, R.L.C. Albuquerque Júnior^{a,*}

^a Tiradentes University, Av. Murilo Dantas, 300, Farolândia, CEP 49030-490, Aracaju/SE, Brazil

^b Federal University of Bahia, Av. Araújo Pinto, 62, Canela, CEP 40110-150, Salvador/BA, Brazil

^c Federal University of Sergipe, Av. Mal. Rondon, s/n, Jardim Rosa Elze, CEP 49100-000, São Cristóvão/SE, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 March 2011

Received in revised form 25 June 2011

Accepted 30 June 2011

Available online 6 July 2011

Keywords:

Dressing

Polymers

Burn healing

Laser

ABSTRACT

This paper aimed to evaluate the improvement of burn wounds healing by sodium alginate/chitosan-based films and laser therapy. Natural polymers with different biological activities are widely used as film dressings to improve wound healing. Lasers arrays accelerate the healing repair of soft tissue injuries. Burn procedures were performed on the backs of 60 male rats assigned into six groups: untreated (CTR), dressed with cellulose films (CT), dressed with sodium alginate/chitosan-based films (SC), laser-irradiated undressed wounds (LT), laser-irradiated wounds with cellulose (CLLT) and sodium alginate/chitosan-based films (SCLT). Laser therapy was applied for 7 days. Animals of each group were euthanised 8 and 14 days after the burn procedures. The inflammatory reaction was significantly more intense in the CTR group than in the irradiated groups after 8 and 14 days. Laser therapy stimulated myofibroblastic differentiation in 8 days, with or without dressing films. Combined laser therapy and both dressings improved epithelialisation, blood vessels formation and collagenization, promoted rapid replacement of type III for type I collagen and favored the better arrangement of the newly formed collagen fibres. The combination of laser therapy and sodium alginate/chitosan-based dressing improves burn healing, apparently by modulating the epithelialisation, blood vessels formation and collagenization processes.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The employment of natural polymers with different mechanical, physical and biological properties as wound dressings has been widely studied based on the many advantages of using these macromolecular agents, such as biocompatibility and their non-irritant and nontoxic properties [1,2]. In addition, wound dressings are thought to prevent loss of body fluid, to prevent exudate build-up, to protect the wounds from external contamination, to have sufficient bactericidal effects to inhibit infection and to prepare an optimum wound bed for autografting [3].

Chitosan is a cationic polysaccharide produced by alkaline N-deacetylation of chitin, with the sugar backbone of chitosan

composed of β -1,4-linked glucosamine units [4]. Chitosan is nontoxic and possesses several unique properties, such as biocompatibility and biodegradability, which make it an attractive candidate for pharmaceutical and biomedical applications. The development and characterisation of chitosan-based films have been previously described [5], and the films have been successfully used as wound dressings [6–9]. Additionally, this polymer has been shown to have potent haemostatic and antimicrobial properties [10].

Alginate is a highly absorbent, gel-forming, biocompatible polymer of guluronic and mannuronic acids used as a carrier for drug delivery and haemostatic wound dressing [11]. Despite the biological properties presented by both biomaterials, there are only a few recent reports that investigate the development of film-based dressings systems based on a combination of chitosan and sodium alginate [12].

Lasers emit a highly concentrated, non-invasive, non-ionising radiation that, when in contact with different tissues, promote thermal, photochemical and nonlinear effects [13]. Several studies have indicated that low level laser therapy (LLLT) modulates different biological activities, such as anti-inflammatory action [14,15], differentiation of fibroblasts into myofibroblasts [16,17], cell proliferation [18], angiogenesis [19] and collagen synthesis [20,21].

* Corresponding author. Address: Post-Graduating Program in Health and Environment, Tiradentes University (Sergipe/Brazil), Av. Murilo Dantas, 300, Farolândia, CEP 49030-490, Aracaju/SE, Brazil. Tel.: +55 79 3218 2100x2615.

E-mail addresses: marxdantas@hotmail.com (M.D.M. Dantas), daniellercavalcante@hotmail.com (D.R.R. Cavalcante), fenaraujo@hotmail.com (F.E.N. Araújo), nanaestetica@oi.com.br (S.R. Barreto), gilberthaciole@hotmail.com (G.T.S. Aciole), albp@ufba.br (A.L.B. Pinheiro), endoribeiro@yahoo.com.br (M.A.G. Ribeiro), isabel_lima_verde@yahoo.com.br (I.B. Lima-Verde), claudiamouramelo@hotmail.com (C.M. Melo), juliana@itp.org.br (J.C. Cardoso), ricardo.patologia@uol.com.br (R.L.C. Albuquerque Júnior).

It has also been demonstrated that LLLT improves burn healing [22,23].

It has been recently demonstrated that the combination of wound dressings and phototherapy accelerate the biological events involved in the healing process [24]. Therefore, the goal of this study was to investigate the effect of the combination of LLLT and sodium alginate/chitosan-based films (SC films) on burn healing in rodents.

2. Material and methods

2.1. Preparation of the sodium alginate/chitosan-based films (SC films)

Polymeric dispersions (1% w/w) were prepared by dissolving chitosan and sodium alginate separately in a diluted acetic acid (0.5 M) solution at room temperature ($21^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$). Glycerol was added to the chitosan dispersion (20% w/w of polymer weight) as a plasticiser. The chitosan dispersion was sonicated to remove air bubbles, dropped into a Petri dish (10.0 mL) and dried thereafter. Subsequently, 10.0 mL of sodium alginate dispersion was cast over the chitosan film and the solvent was allowed to evaporate. The resulting films were manually peeled off and then cut into samples of 20 mm \times 20 mm.

2.2. Animals

Prior to beginning any experimental procedures, this study was approved by our Animal Care and Use Committee (register 040508). In accordance to the institution's guidelines outlined in "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals", all animals received humane care during all steps of the experimentation. Furthermore, the study protocols were approved by National Research Council prior to beginning the experiments.

The animals used in this experiment were adult male *Rattus norvegicus albino*, Wistar strain, weighing $250 \text{ g} \pm 50 \text{ g}$. The rats were housed in clear plastic cages with solid floors and loose hardwood chip bedding and were supplied with food and water *ad libitum* in a temperature and humidity-controlled environment.

2.3. Burning procedures and groups formation

Sixty rats were anesthetised with an intraperitoneal ketamine-xylazine injection (100 mg/kg–5 mg/kg) and 1 cm² burn wounds were created on the backs of the animals. This was accomplished using a brass probe that had been immersed in boiling (100 °C) water until thermal equilibrium was achieved, which was then placed without pressure for 20 s on the previously shaved dorsal region of the rats [25]. The animals were handled in accordance with aseptic principles in order to avoid exogenous bacterial contamination. Subsequently, the rats were randomly assigned into six groups of ten animals each, according to the treatment of the burn wounds: untreated (CTR), dressed with a commercially available cellulose film (CL), dressed with sodium alginate/chitosan-based films (SC), undressed, laser-irradiated (LT), dressed with cellulose, laser-irradiated (CLLT) and dressed with sodium alginate/chitosan-based film (SCLT).

2.4. LLLT procedure

Animals were submitted to daily transcutaneous irradiation using a previously calibrated semi-conductor diode laser GaAlAs (Twin Laser®, MMOptics, São Paulo, Brazil) with continuous emission at 780 nm wavelength for 100 s (25 S each point). The output power used was 40 mW, with a focal spot of 0.04 cm², and power density of 1 W/cm². The total energy per session was estimated in

4 J and the energy density was 20 J/cm² distributed in four different equidistant points (5 J/cm² each) over the course of 7 days. The first irradiation was performed immediately after the burning procedures (Fig. 1).

2.5. Euthanasia and histological procedure

The sacrifice of the animals was performed using CO₂ chamber. After the sacrifice, the burn wounds were surgically removed and the specimens were formalin-fixed and paraffin-embedded according to routine laboratory techniques. Subsequently, a series of 5 μm thick sections were obtained, stained in haematoxylin-eosin and picrosirius and submitted to immunohistochemical techniques.

2.6. Assessment of the inflammatory profile (IP)

Histological sections stained in haematoxylin-eosin were used for the descriptive analysis of the inflammatory profile (IP). The intensity of the inflammatory response was classified as follows: 0 (absence of inflammatory response), 1 (inflammatory cells representing less than 10% of the cell population observed within the wound area), 2 (inflammatory cells representing between 10% and 50% of the cell population observed within the wound area), and 3 (inflammatory cells representing more than 50% of the cell population observed within the wound area). Moreover, the inflammatory profile (IP) was classified as acute (predominance of polymorphonuclear cells) or chronic (predominance of mononuclear cells) and graded as slight/absent, moderate or severe.

2.7. Assessment of the epithelialisation rates (ER)

In order to assess the epithelialisation rate (ER), photomicrographs of the histological sections of the wounds (stained in HE) were taken from all the samples (40 \times) and processed using software (ImageLab®, Sof- tium, São Paulo, SP, Brazil). The total wound surface extent (TWE) was assessed, as well as the extent of the epidermal migration from the normal wound margin to the point where the migrating epithelium stopped processing (ME). ER (%) was determined as follows: ER (%) = (ME \times 100)/TWE.



Fig. 1. Skin after the burn procedure showing the applied dressing and the four points treated with laser.

2.8. Immunohistochemical assessment of myofibroblasts (MF) and blood vessel content (BV)

Myofibroblasts and blood vessels were detected using monoclonal antibodies against the α -smooth muscle actin antigen (α -SMA) (clone 1A4; 1:200, 12 h, Dako, Glostrup, Denmark) and the CD31 antigen (clone JC/70; 1:200, 12 h, Dako, Glostrup, Denmark), respectively. After washing in Phosphate-buffered saline solution (PBS), slides were incubated with biotin-labelled antimouse secondary antibodies (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA) then washed in PBS and incubated with peroxidase-labelled streptavidin (Dako). The reaction products were visualised by immersing the slides in freshly prepared diaminobenzidine (Dojindo, Kumamoto, Japan). Ten histological sections (400 \times magnification, 0.739 mm 2 per field) were randomly selected and the means of numbers of immunostained cells and vessels for a histological field were assessed with an image analysis system ImageLab® (Sof-tium, São Paulo, SP, Brazil) as previously described by Ribeiro et al. [17].

2.9. Descriptive morphological study of the collagenization

Histological sections stained in picrosirius and analysed under polarised light were used for the descriptive analysis of the collagen deposition. Collagen fibres were categorised according to their birefringence pattern (greenish/yellow-greenish or orange/orange-reddish), morphological appearance (wavy or stretched, thin or thick, short or long) and disposition (reticular, parallel or interlaced).

2.10. Quantitative analysis of the collagenization rate (CR)

Quantization of the area occupied by collagen depositions in the healing area was determined by optical density in the image analysis system in different randomly selected fields. The system used consisted of a CCD Sony DXC-101 camera applied to an Olympus CX31 microscope, from which the images were sent to a monitor (Trinitron Sony). By means of a digitising system (Olympus C-7070 WIDEZOOM) the images were loaded onto a computer (Pentium 133 MHz) and processed using software (ImageTool). A total of 10 fields per case were analysed at a magnification of 100 \times . The thresholds for collagen fibres were established for each slide after enhancing the contrast up to a point at which the fibres were easily identified as birefringent (collagen) bands. The area occupied by the fibres was determined by digital densitometric recognition by adjusting the threshold level of measurement up to the different colour densities of the collagen fibres. The area occupied by the fibres was divided by the total area of the field. The results were expressed as a percentage of the skin area fraction occupied by the collagen fibres and described as collagenization rates (CR).

2.11. Statistical analysis

Statistical significance of the ER, MF, BV and CR quantitative measurements were assessed by analysis of variance (one-way ANOVA) and the Tukey test. The IP was analysed using the Kruskall Wallis and Dunn post hoc tests. Each time point was analysed separately, and two-tailed α -levels of $p \leq 0.05$ were regarded as significant.

3. Results

3.1. Analysis of the inflammatory profile (IP)

At 8 days, the inflammatory infiltrate was acute in the CTR group and subacute in the other groups. In 14 days, the infiltrate

was chronic in all of the groups (Fig. 2). The severity of the inflammatory infiltrate ranged from intense to moderate at 8 days and from moderate to absent at 14 days (Table 1). At 8 days, the IP was significantly more intense in the CTR group than in the LT ($p = 0.04$), CLLT ($p = 0.04$) and SCLT ($p = 0.04$) groups, but no other significant difference was evident among the groups, either at the 8- or 14-day mark ($p > 0.05$).

3.2. Analysis of the epithelisation rate (ER)

At 8 days, the ER was significantly higher in all the groups other than in the CTR group ($p < 0.01$), whereas the LT, CLLT and SCLT groups showed higher rates in comparison to the non-irradiated groups ($p < 0.05$). At 14 days, the ER was more advanced in the LT, CLLT and SCLT groups ($p < 0.05$). Additionally, the SCLT group was more effective in improving ER than were the LT and CLLT groups ($p < 0.05$) (Fig. 3).

3.3. Blood vessel content (BV)

CD31-positive blood vessels were identified by the brown stain (Fig. 4). At 8 days, the CL and SC groups showed significant increases in the blood vessel content compared to the CTR group ($p < 0.05$). However, all irradiated groups presented more conspicuous vascular content than did the non-irradiated groups, and the mean count of blood vessels was significantly higher in the SCLT group ($p < 0.05$). At 14 days, there was a clear reduction in the vascularisation process in all experimental groups, but the control group (CTR) showed a slight increase in the mean of newly formed blood vessels (Fig. 5).

3.4. Myofibroblasts content (MF)

α -SM-positive myofibroblasts were seen as brown spindle-shaped cells scattered in the connective tissue (Fig. 6). At 8 days, the LT, CLLT and SCLT groups showed a significant increase in MF. At 14 days, there was a clear decrease in the content of this cell subset in all the groups, but this reduction was significantly more conspicuous in the irradiated groups, irrespective the use of dressing films (Fig. 7).

3.5. Morphological analysis of collagenization

As shown in Fig. 8, at 8 days, collagen fibre deposition was unremarkable in the CTR group. In the CL group, extremely delicate greenish or yellow-greenish fibrillar structures (type-III collagen) with varied dimensions and reticular dispositions were observed. In the SC group, type-III collagen fibres were more distinguishable. The interfibrillar spaces were large and numerous in all three non-irradiated groups. In the LT, CLLT and SCLT groups, the bundles were longer and slightly wavy, with birefringence ranging from yellow to orange (type-I collagen), and tended to be arranged in a parallel disposition, but they were thicker and denser in the latter. At 14 days, the type I collagen fibres were thin, delicate and irregularly disposed in CTR but were arranged in a parallel manner in the CL group. In the SC and LT groups, the fibres were grosser and thicker and arranged in parallel dispositions, although some areas presented a slightly interlaced arrangement. The CLLT and SCLT groups presented dense, thick, grossly interlaced type-I collagen bundles, although the superficial fibres tended to show parallel dispositions, with scant interfibrillar spaces.

3.6. Quantitative analysis of the collagenization rate (CR)

As shown in Fig. 9, the quantitative analysis of the collagen deposition revealed that, at 8 days, the content of collagen fibres

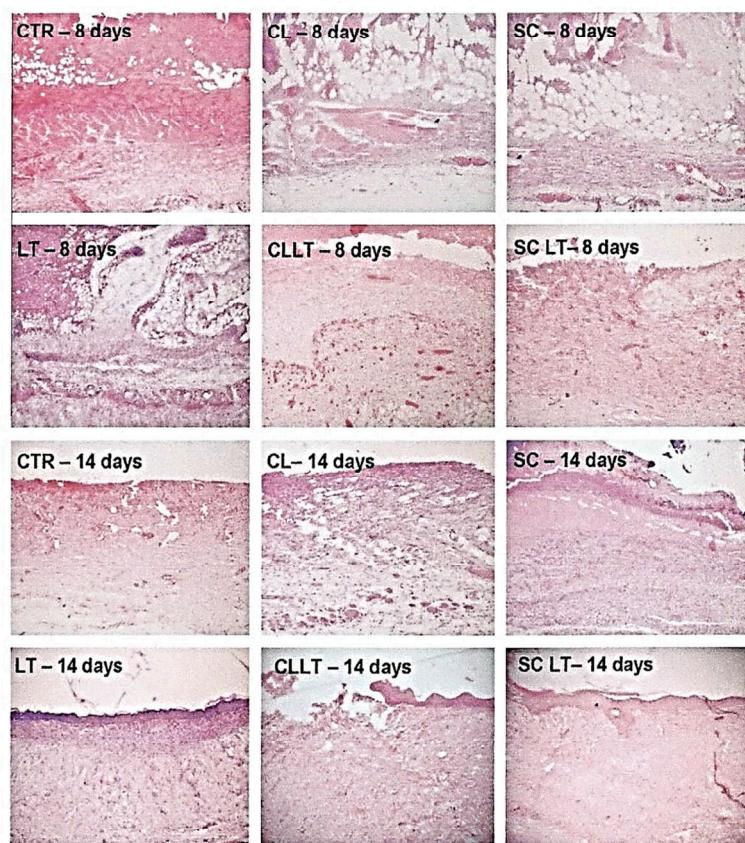


Fig. 2. Histological features of the burn wounds in 8 and 14 days untreated (CTR), dressed with commercial cellulose-based films (CL), dressed with sodium alginate/chitosan-based films (SC), and laser-irradiated undressed (LT), cellulose-based dressed (CLLT) and sodium alginate/chitosan-based dressed wounds (SCLT). The intense vascular content in CLLT and SCLT in 8 days and the absence of conspicuous inflammatory infiltrate in 14 days (HE, 100x).

Table 1
Analysis of the severity of the inflammatory infiltrate in the experimental groups on the 8th and 14th days.

Time	Animals	Groups					
		CTR	CL	SC	LT	CLLT	SCLT
8 days	R1	3	2	3	2	2	2
	R2	3	2	2	2	2	2
	R3	3	3	2	2	2	2
	R4	3	3	2	2	2	2
	R5	3	2	3	2	2	2
	R6	3	3	2	2	2	2
14 days	R1	2	2	1	0	1	0
	R2	2	1	0	0	0	0
	R3	2	1	1	0	0	0
	R4	1	2	1	1	0	1
	R5	2	1	2	0	0	0
	R6	3	2	1	1	1	1

(0) – inflammatory infiltrate is absent; (1) – mild inflammatory infiltrate corresponding to less than 10% of stromal cells; (2) moderate inflammatory infiltrate corresponding to more than 10 and less than 50% of stromal cells; (3) intense inflammatory infiltrate corresponding to more than 50% of stromal cells.
R1-R6 – animals from each experimental group (6 animals/group).

was significantly less expressive in the CTR group than in the LT ($p = 0.02$), CLLT ($p = 0.02$) and SCLT ($p = 0.01$) groups, but there

was no difference among the other groups. At 14 days, the collagenization rates in the CTR and CL groups were similar ($p = 0.55$) but

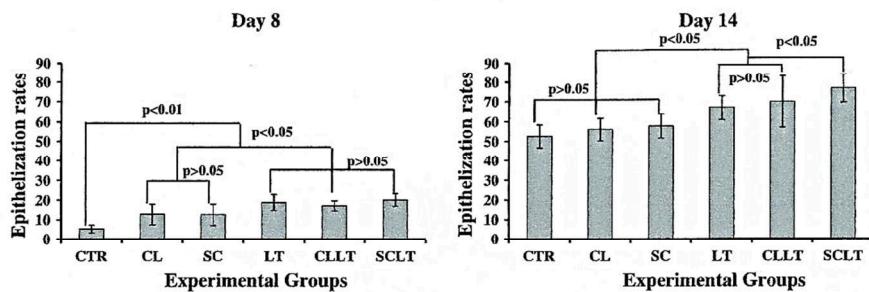


Fig. 3. Assessment of the epithelialisation rates of the burn wounds after 8 or 14 days.

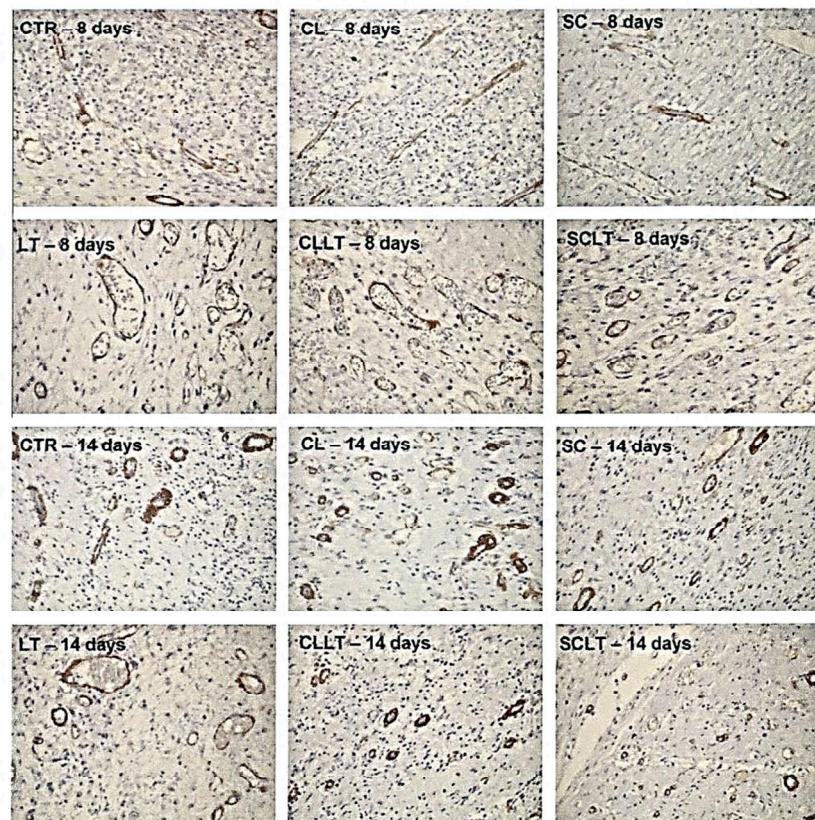


Fig. 4. Immunopositivity for CD 31 in the blood vessels within the burned area of the experimental groups. In 8 days the blood vessel content seemed more remarkable in the laser irradiated groups. In 14 days, the blood vessels appeared smaller, less congested and with thicker walls than in 8 days (LSA, 400x).

significantly less expressive than in the SC ($p = 0.01$ and 0.03), LT ($p = 0.00$ and 0.05), CLLT ($p = 0.00$ and 0.04) and SCLT groups ($p = 0.01$ and 0.05).

4. Discussion

Considering the fact that extensive burn wounds produce substantial skin epithelial denudation, the use of dressing films is very important in order to prevent loss of fluids and avoid external bac-

terial contamination [1,2,26]. In this study, the application of both types of dressing films on the burn wounds provided earlier chronicity of the inflammatory response, better epithelialisation, improved blood vessels supply and collagenization compared to undressed wounds (CTR). The advantages of the use of cellulose dressing films on burn wounds are well established in experimental models [2] and clinical trials [27], but this is the first report asserting that sodium alginate/chitosan-based films (SCs) promote the very same biological activities in burn healing.

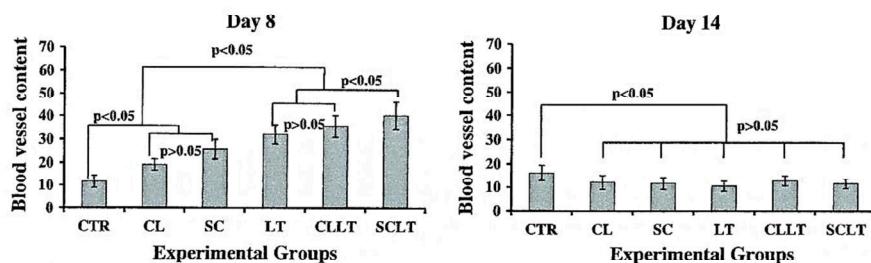


Fig. 5. Quantitative analysis of the immunostained blood vessel content within the wound area 8 and 14 days after the burn procedures.

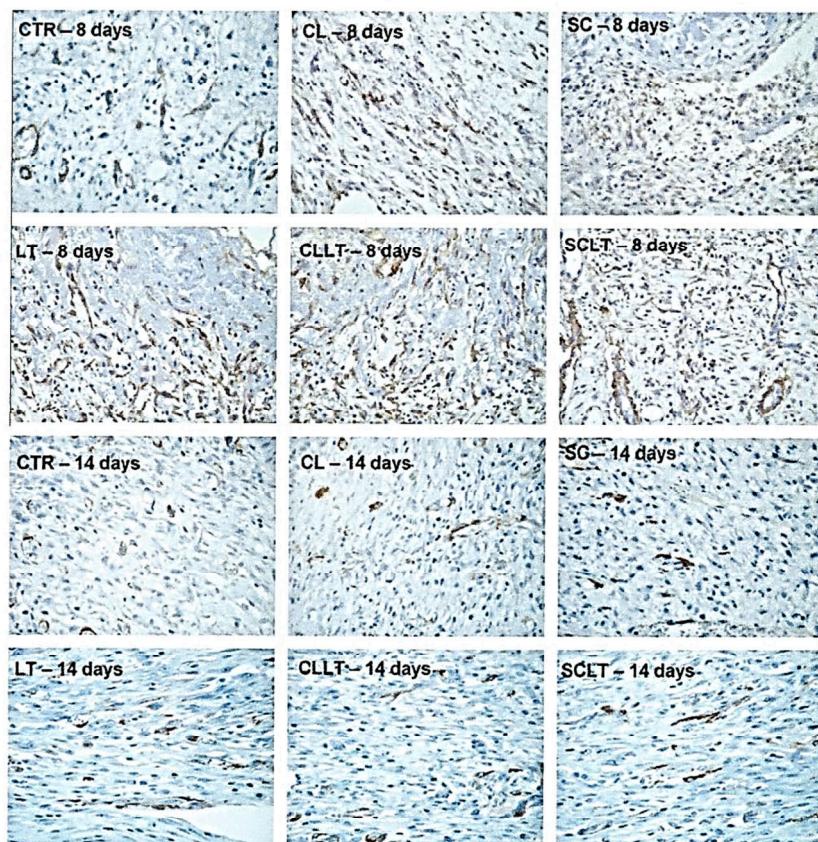


Fig. 6. Immunopositivity for α -SMA in myofibroblasts within the burned area of the experimental groups. The myofibroblasts are more evident and scattered in the connective tissue in 8 days, whereas in 14 days this cell subset is less abundant and appears to be disposed along the direction of the collagen bundles (LSAB, 400 \times).

The benefits of LLLT on the healing process have been extensively investigated [17,21–23]. In this study, LLLT provided a significant decrease in the severity of the inflammatory response, irrespective of the combination with the dressing films. This activity might be related to the inhibitory effect of laser energy on the release of prostaglandin and TNF- α [28], mast cell degranulation [29] and on lymphocytic proliferation [17]. LLLT also significantly improved angiogenesis and blood vessels formation, as reported in previous studies [19]. Additionally, it has been demonstrated that the more rapid onset of the vascular steps of wound healing improves dermal healing and scar formation [14,15,17,21,26].

The epithelisation process was more effective in irradiated groups as well. These findings are supported by previous studies asserting that LLLT stimulates the migration of keratinocyte along the healing wound surface *in vivo* [30] and provides keratinocyte proliferation *in vitro* [31].

Myofibroblasts are a cell type involved in wound contraction, which is a crucial event leading to the proper healing of larger wounds, with extensive loss of cells and tissue [16]. These cell subsets present a contractile phenotype characterised by a cytoskeleton rich in actin microfilaments, and they can be identified by immunohistochemistry due to their extensive positivity for α -

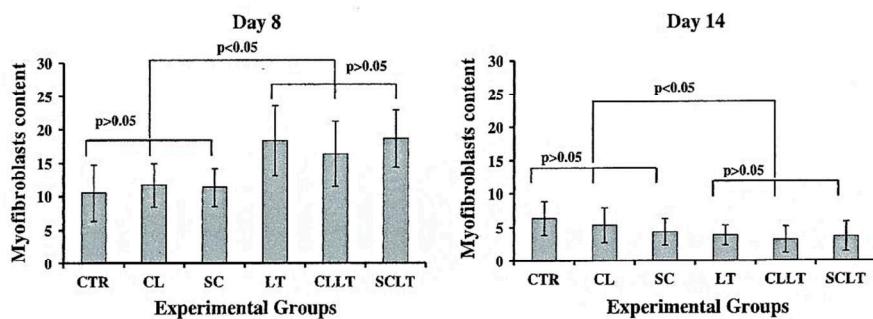


Fig. 7. Quantitative analysis of myofibroblasts content within the wound area 8 and 14 days after the burn procedures.

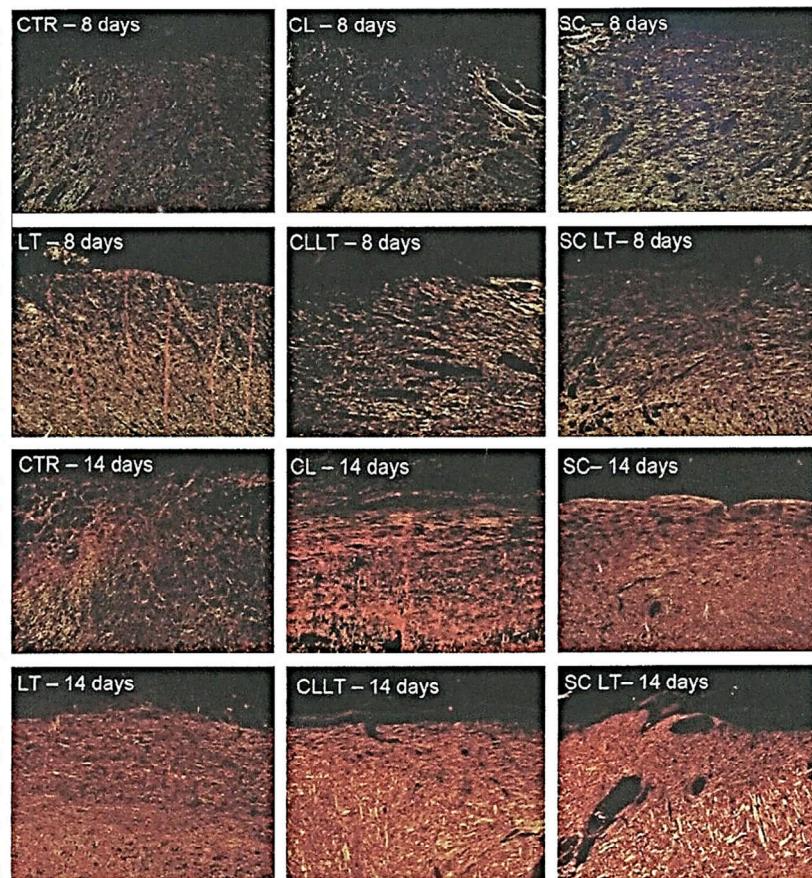


Fig. 8. Histological features of the burn wounds in 8 and 14 days untreated (CTR), dressed with commercial cellulose-based films (CL), dressed with sodium alginate/chitosan-based films (SC), and laser-irradiated undressed (LT), cellulose-based dressed (CLLT) and sodium alginate/chitosan-based dressed wounds (SCLT). The reticular arrangement of type III collagen fibres in CTR, CL, SC and LT, and a parallel disposition in CLLT and SCLT in 8 days. In 14 days, gross type I collagen fibres are compacted and interlaced in CLLT and SCLT, resembling the normal dermis (Sirius Red, 100x).

SMA (alpha smooth muscle actin) [17]. In this study, LLLT seemed to enable fibroblasts to undergo transformation into myofibroblasts. Although the precise mechanism is still unclear, it has been suggested that there is a possible correlation to laser-induced upregulation of ceratin cytokines responsible for myofibroblastic

differentiation, such as TGF- β [16,17,32]. However, further investigations are still required to fully clarify the biochemical events underlying the laser-induced myofibroblastic differentiation.

In this study, LLLT promoted more rapid replacement of the immature type-III collagen for mature type-I collagen fibres and

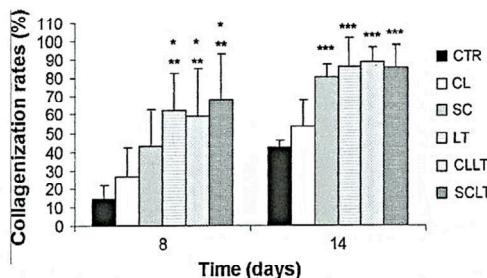


Fig. 9. Assessment of the collagenization rates of the burn wounds in 8 and 14 days.

*Significantly different from CTR ($p < 0.01$).

**Significantly different from CL ($p < 0.05$).

***Significantly different from CTR and CL ($p < 0.05$).

improved the collagenization rates at both 8 and 14 days. Similar stimulatory effects on the connective tissue during wound healing have been previously reported, attesting LLLT positive role in the collagen synthesis and remodelling [20,21]. Supporting these findings, previous studies have demonstrated that LLLT is able to upregulate the release of cytokines responsible for fibroblast proliferation and collagen synthesis, such as FGF- α and TGF- β , respectively [33,34].

It has been previously reported that the combination of cellulose-based films with LLLT may be quite advantageous for the healing process, supposedly because of the protective effects of the films combined with the wide range of biological activities induced by the laser irradiation [24]. However, this is the first report concerning the benefits of the combination of LLLT and sodium alginate/chitosan-based dressing films on burn healing. The beneficial synergism of these films and LLLT might have resulted from possible anti-inflammatory activities of chitosan and alginates, as long as both molecules are able to inhibit the production of pro-inflammatory cytokines, such as TNF- α and IL-6 [35,36]. Furthermore, antifungal [4] and antimicrobial properties [10] have already been reported to be associated with the beneficial effects of chitosan on wound healing.

This study also provided evidence that positive effect might be related to a possible improvement in the newly formed blood vessel content and epithelialization process. It has been demonstrated that chitosan is able to improve epithelial proliferation and granulation tissue formation during wound healing [37]. These properties were probably potentiated by LLLT biostimulatory activity. Additionally, the contents of the blood vessel were significantly reduced in the CLLT and SCLT groups at 14 days. These findings suggest that the combined usage of laser therapy and both dressing film types improved the blood vessels formation in the earlier phases of burn healing without inducing an undesirable long-term maintenance of the vascular supply, which could impair the final scar formation.

Regarding collagenization, this combination resulted in more positive effects than the one noticed in the other groups. It has been demonstrated that LLLT not only improves the collagen deposition [21] but also provides better architectural organization of the collagen fibres [20]. However, previous reports have also suggested an involvement of alginates in collagenization dynamics since these polymers are able to inhibit the activity of hyaluronidases, enzymes involved in the degradation and remodelling of the extracellular matrix [38]. Therefore, our findings regarding collagenization are possibly a result of the synergism between the biological activities provided by the laser and the chemical compounds of the SC films.

In conclusion, the combination of low level laser therapy and a sodium alginate/chitosan-based dressing was able to provide

substantial improvement in burn healing, particularly with regard to epithelialization and blood vessels supply, and it promoted the better arrangement and compact disposition of newly formed collagen fibres.

Acknowledgement

We would like to thank the Brazilian Council for Science and Research (CNPq – Conselho Nacional de Pesquisa) for the financial support.

References

- [1] S. Kordestani, M. Shahrezaee, M.N. Tahmasebi, H. Hajimahmodi, D.H. Ghasemali, M.S. Abyaneh, A randomized controlled trial on the effectiveness of an advanced wound dressing used in Iran, *J. Wound Care* 17 (2008) 323–327.
- [2] S. Thomas, A review of the physical, biological and clinical properties of a bacterial cellulose wound dressing, *J. Wound Care* 17 (2008) 349–352.
- [3] J.S. Lee, Y.S. Cho, J.W. Lee, H.J. Kim, D.G. Pyun, M.H. Park, T.R. Yoon, H.J. Leen, Y. Kuroyanagi, Preparation of wound dressing using hydrogel polyurethane foam, *Trends Biomater. Artif. Organs* 15 (2001) 4–6.
- [4] Y. Park, M.H. Kim, S.C. Park, H. Cheong, M.K. Jang, J.W. Nah, K.S. Hahn, Investigation of the antifungal activity and mechanism of action of LMWS-chitosan, *J. Microbiol. Biotechnol.* 18 (2008) 1729–1734.
- [5] K. Peh, T. Khan, H. Chung, Mechanical, bioadhesive strength and biological evaluations of chitosan films for wound dressing, *J. Pharm. Pharm. Sci.* 3 (2000) 303–311.
- [6] T.A. Khan, K.K. Peh, A preliminary investigation of chitosan film as dressing for punch biopsy wounds in rats, *J. Pharm. Pharm. Sci.* 6 (2003) 20–26.
- [7] C. Alemdaroğlu, Z. Değim, N. Çelebi, F. Zor, S. Öztürk, D. Erdogan, An investigation on burn wound healing in rats with chitosan gel formulation containing epidermal growth factor, *Burns* 32 (2006) 319–327.
- [8] G.D.H. Rao, N.N. Balasubramanian, B.J. William, S. Prathaban, Clinical evaluation of chitin and chitosan in the management of wounds, *Tamilnadu, J. Vet. Animal Sci.* 3 (2007) 160–163.
- [9] M. Burkatskaya, A.P. Castano, T.N. Demidova-Rice, G.P. Tegos, M.R. Hamblin, Effect of chitosan acetate bandage on wound healing in infected and noninfected wounds in mice, *Repair Regen.* 16 (2008) 425–431.
- [10] S.Y. Ong, J. Wu, S.M. Mochihata, M.H. Tan, J. Lu, Development of a chitosan-based wound dressing with improved hemostatic and antimicrobial properties, *Biomaterials* 29 (2008) 4323–4332.
- [11] J.O. Kim, J.K. Park, J.H. Kim, S.G. Jin, C.S. Yong, D.X. Li, J.Y. Choi, J.S. Woo, B.K. Yoo, W.S. Lyoo, J.A. Kim, H.G. Choi, Development of polyvinyl alcohol–sodium alginate gel-matrix-based wound dressing system containing nitrofurazone, *Int. J. Pharm.* 359 (2008) 79–86.
- [12] H.N. Pei, X.G. Chen, Y. Li, H.Y. Zhou, Characterization and ornidazole release in vitro of a novel composite film prepared with chitosan/poly(vinyl alcohol)/alginate, *J. Biomed. Mater. Res. A* 85 (2008) 566–572.
- [13] M.R. Hamblin, T.N. Demidova, Mechanisms of low-level light therapy, *Proc. SPIE* 6140 (2006) 1–11.
- [14] F. Correa, R.A. Lopes Martins, J.C. Correa, V.V. Iversen, J. Joenson, J.M. Bjordal, Low-level laser therapy (GaAs $\lambda = 904$ nm) reduces inflammatory cell migration in mice with lipopolysaccharide-induced peritonitis, *Photomed. Laser Surg.* 25 (2007) 245–249.
- [15] E.S. Boschi, C.E. Leite, V.C. Saciura, E. Caberlon, A. Lunardelli, S. Bittencourt, D.A. Melo, J.R. Oliveira, Anti-Inflammatory effects of low-level laser therapy (660 nm) in the early phase in carrageenan-induced pleurisy in rat, *Lasers Surg. Med.* 40 (2008) 500–508.
- [16] A.P. Medrado, L.S. Pugliesi, S.R. Reis, Z.A. Andrade, Influence of low level laser therapy on wound healing and its biological action upon myofibroblasts, *Lasers Surg. Med.* 32 (2003) 239–244.
- [17] M.A. Ribeiro, R.L. Albuquerque, L.M. Ramalho, A.L. Pinheiro, L.R. Bonjardim, S.S. Da Cunha, Immunohistochemical Assessment of Myofibroblasts and Lymphoid Cells During Wound Healing in Rats Subjected to Laser Photobiomodulation at 660 nm, *Photomed. Laser Surg.* 27 (2009) 49–55.
- [18] W.P. Hu, J.J. Wang, C.L. Yu, C.C. Lan, G.S. Chen, H.S. Yu, Helium-neon laser irradiation stimulates cell proliferation through photostimulatory effects in mitochondria, *J. Invest. Dermatol.* 127 (2007) 2048–2057.
- [19] A.V. Corazza, J. Jorge, C. Kurachi, V.S. Bagnato, Photobiomodulation on the angiogenesis of skin wounds in rats using different light sources, *Photomed. Laser Surg.* 25 (2007) 102–106.
- [20] A.P. Medrado, A.P. Soares, E.T. Santos, S.R. Reis, Z.A. Andrade, Influence of laser photobiomodulation upon connective tissue remodeling during wound healing, *J. Photochem. Photobiol. B* 92 (2008) 144–152.
- [21] M.A.G. Ribeiro, R.L.C. Albuquerque, A.L.S. Barreto, V.G.M. Oliveira, T.B. Santos, C.D.F. Dantas, Morphological analysis of second-intention wound healing in rats submitted to 16 J/cm² λ 660-nm laser irradiation, *Indian J. Dent. Res.* 20 (2009) 390.
- [22] M.S. Ribeiro, F. Silva, C.E. Araújo, S.F. Oliveira, C.M. Pelegri, T.M. Zorn, D.M. Zzell, Effect of low-intensity polarized visible Laser radiation on skin burns: a light microscopy study, *J. Clin. Laser Med. Surg.* 22 (2004) 59–66.

- [23] M. Bayat, M.M. Vasheghani, N. Razavi, Effect of low-level helium-neon laser therapy on the healing of third-degree burns in rats, *J. Photochem. Photobiol. B* 83 (2006) 87–93.
- [24] L.P. Soares, M.G. Oliveira, A.L. Pinheiro, B.R. Fronza, M.E. Maciel, Effects of laser therapy on experimental wound healing using oxidized regenerated cellulose hemostat, *Photomed. Laser Surg.* 26 (2008) 10–13.
- [25] M. Hosnute, A. Gurel, O. Babucu, F. Armutcu, E. Kargi, A. Isikdemir, The effect of CAPE on lipid peroxidation and nitric oxide levels in the plasma of rats following thermal injury, *Burns* 30 (2004) 121–125.
- [26] R.L.C. Albuquerque-Júnior, A.L.S. Barreto, J.A. Pires, P.F. Reis, S.O. Lima, M.A.G. Ribeiro, J.C. Cardoso, Effect of bovine type-I collagen based films containing red propolis on dermal wound healing in rodent model, *Int. J. Morphol.* 27 (2009) 1105–1110.
- [27] H.R. Alves, P.C. Almeida, V.A. Grillo, P. Smaniotti, D.V. Santos, M.C. Ferreira, Clinical experiences of using a cellulose dressing on burns and donor site wounds, *J. Wound Care* 18 (2009) 27–30.
- [28] Y. Sakurai, M. Tamaguchi, Y. Abiko, Inhibitory effect of low-level laser irradiation on LPS-stimulated prostaglandin E2 production and cyclooxygenase-2 in human gingival fibroblasts, *Eur. J. Oral Sci.* 108 (2000) 29–34.
- [29] M.C.M.C. Pereira, C.B. Pinho, A.R.P. Medrado, Z.A. Andrade, S.R.A. Reis, Influence of 670 nm low-level laser therapy on mast cells and vascular response of cutaneous injuries, *J. Photochem. Photobiol. B* 98 (2010) 188–192.
- [30] A.C. Freitas, A.L. Pinheiro, P. Miranda, F.A. Thiers, A.L. Vieira, Assessment of inflammatory effect of 830 nm laser light using C-reactive protein levels, *Bras. Dent. J.* 12 (2001) 187–190.
- [31] F.P. Eduardo, D.U. Mehnert, T.A. Monezi, D.M. Zezell, M.M. Schubert, C.P. Eduardo, M.M. Marques, Cultured epithelial cells response to phototherapy with low intensity laser, *Lasers Surg. Med.* 39 (2007) 365–372.
- [32] T.N. Demidova-Rice, E.V. Salomatina, A.N. Yaroslavsky, I.M. Herman, M.R. Hamblin, Low-level light stimulates excisional wound healing in mice, *Lasers Surg. Med.* 39 (2007) 706–715.
- [33] A.N. Pereira, C.D.E.P. Eduardo, E. Matson, M.M. Marques, Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts, *Lasers Surg. Med.* 31 (2002) 263–267.
- [34] M.C.M.C. Pereira, C.B. Pinho, A.R.P. Medrado, Z.A. Andrade, S.R.A. Reis, Influence of 670 nm low-level laser therapy on mast cells and vascular response of cutaneous injuries, *J. Photochem. Photobiol. B* 98 (2010) 188–192.
- [35] S.E. Barnett, S.J. Varley, The effects of calcium alginate on wound healing, *Ann. R. Coll. Surg. Engl.* 69 (1987) 153–155.
- [36] M.S. Kim, M.J. Sung, S.B. Seo, S.J. Yoo, W.K. Lim, H.M. Kim, Water-soluble chitosan inhibits the production of pro-inflammatory cytokine in human astrocytoma cells activated by amyloid beta peptide and interleukin-1beta, *Neurosci. Lett.* 321 (2002) 105–109.
- [37] I.A. Alsarraf, Chitosan topical gel formulation in the management of burn wounds, *Int. J. Biol. Macromol.* 45 (2009) 16–21.
- [38] M. Asada, M. Sugie, M. Inoue, K. Nakagomi, S. Hongo, K. Murata, S. Irie, T. Takeuchi, N. Tomizuka, S. Oka, Inhibitory effect of alginic acids on hyaluronidase and on histamine release from mast cells, *Biosci. Biotech. Biochem.* 61 (1997) 1030–1032.

**ANEXO C: ARTIGO SUBMETIDO E COMPROVANTES DE DA
SUBMISSÃO: "Evaluation of antinociceptive and anti-inflammatory activity of
low-level laser therapy on TMJ inflammation in rodents"**

Buscar no Yahoo! Mail Buscar na Web  0

ENTRADA	CONTATOS	AGENDA	Your PDF has been b...			Confirmation of Sub...	
Escrever		Apagar	Mover	Spam	Ações		
Entrada (183)		Confirmation of Submission				Dom, 21 Abr 2013 às 18:17	
Conversas		De "J. of Photochem. & Photobiol. B					
Rascunhos (21)		Para nanaestetica@yahoo.com.br nanaestetica1@gmail.com					
Enviadas							
Spam (12)		<p>Dear Prof. Sandra Regina Barreto,</p> <p>Your submission, entitled "Evaluation of antinociceptive and anti-inflammatory activity of low-level laser therapy on TMJ inflammation in rodents.", has been received by the online submission system of the Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.</p> <p>In due course, your manuscript will be given a reference by the Editor and you will be notified by e-mail.</p> <p>Thank you for submitting your work to this journal.</p> <p>Kind regards,</p> <p>Elsevier Editorial System Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology</p> <p>For further assistance, please visit our customer support site at http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.</p>					
PASTAS							
MESSENGER							
APLICATIVOS							

Cover Letter

21 th April 2013.

Prof. Dr. Laszlo Matyus

Editor-in-Chief, Journal of Photochemistry and Photobiology B Biology, responsible for: Biophysics, Biomolecular spectroscopy, Photodynamic Therapy, Dermatology, Photomedicine

Dear Prof Dr Laszlo Matyus

Please find enclosed the manuscript entitled: "Evaluation of antinociceptive and anti-inflammatory activity of low-level laser therapy on TMJ inflammation in rodents".

We would like to submit this manuscript to Journal of Photochemistry and Photobiology B Biology , because we do believe that our results reinforce the importance of the use of laser therapy in the treatment of temporomandibular disorder. This study is the first one the associate This study is the first to associate the antinociceptive effect to the anti-inflammatory activity of the LLLT and therefore we would like to use this important means of communication to disseminate our findings among the renowned researchers.

All authors certify that the institution has approved the protocols for any investigation involving animals and that all experimentation was conducted in conformity with ethical and humane principles of research in according to the international, national and institutional rules considering animal experiments.

Thank you very much for your attention.
I look forward to hearing from you in due course.
Your sincerely,

MSc. Sandra Regina Barreto

Department of Dentstry

Tiradentes University

Av. Murilo Dantas, 300, Farolandia cep: 49030-490 Aracaju/SE, Brazil

Evaluation of anti-nociceptive and anti-inflammatory activity of low-level laser therapy on temporomandibular joint inflammation in rodents.

S.R. Barreto^a, G.C. de Melo^a, J.C. dos Santos^a, M.G.B. de Oliveira^b, R.N. Pereira-Filho^a, A.V.F. Alves^a, M.A.G. Ribeiro^b, I.B. Lima-Verde^a, Lucindo José Quintans Júnior^b, R.L.C. de Albuquerque-Júnior^a, L.R. Bonjardim^b.

^a Tiradentes University, Av. Murilo Dantas, 300, Farolândia, CEP 49030-490, Aracaju/SE, Brazil

^b Federal University of Sergipe, Av. Mal. Rondon, s/n, Jardim Rosa Elze, CEP 49100-000, São Cristóvão/SE, Brazil

Corresponding Author:

Sandra Regina Barreto (S.R. Barreto):

Address: R. Dep. Euclides Paes Mendonça, nº 316 edf. Nice apt. 1201, 13 de Julho, CEP 49020-460, Aracaju/SE, Brazil

Tel: (+55)079-8107-7266

E-mail: nanaestetica@yahoo.com.br

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the analgesic and anti-inflammatory activity of low-level laser therapy (LLLT) on the nociceptive behavioral as well as histomorphological aspects induced by injection of formalin and carrageenan into the rat temporomandibular joint. The 2.5% formalin injection (FRG group) induced behavioral responses characterized by rubbing the orofacial region and flinching the head quickly, which were quantified for 45 min. The pretreatment with systemic administration of diclofenac sodium-DFN group (10mg/kg i.p.) as well as the irradiation with LLLT infrared (LST group) significantly reduced the formalin-induced nociceptive responses. The 1% carrageenan injection (CRG group) induced inflammatory responses over the time-course of the study (24 h, and 3 and 7 days) characterized by the presence of intense inflammatory infiltrate rich in neutrophils, scanty areas of liquefactive necrosis and intense interstitial edema, extensive hemorrhagic areas, and enlargement of the joint space on the region. The DFN and LST groups showed an intensity of inflammatory response that was significantly lower than in CRG group over the time-course of the study, especially in the LST group, which showed exuberant granulation tissue with intense vascularization, and deposition of newly formed collagen fibers (3 and 7 days). It was concluded that the LLLT presented an anti-nociceptive and anti-inflammatory response on the inflammation induced in the temporomandibular joint of rodents.

Keywords: Temporomandibular disorder; low level laser therapy; laser; inflammation; temporomandibular joint.

1 INTRODUCTION

The temporomandibular joint (TMJ) is a highly specialized joint whose activity depends on the anatomical and functional stability of the stomatognathic system. Temporomandibular disorder (TMD) is the communal term that describes a number of clinical conditions involving the TMJ, the masticatory muscles, or both of them [1]. TMDs affect approximately 12% of the population in general and frequently have an inflammatory component [2,3].

Pain is a common finding in TMD and is usually the reason that leads the patient to seek professional help [4,5]. The treatment of acute TMD is routinely carried out with non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), a class of drugs able to inhibit one or more of the isoforms of cyclooxygenase. As a result, there is a block of the conversion of arachidonic acid into prostaglandins, which is one of the major biochemical mediators of the inflammatory response [6,7]. However, these drugs may cause side effects, such as gastrointestinal toxicity [8] and risk of thrombotic events [9], particularly if used for long-term treatment. Temporomandibular disorder is considered to be a subgroup of the musculoskeletal disorders [10], which might explain previous reports of the successful response to physical therapies [11].

Low-level laser therapy (LLLT) is a light-source treatment that generates light of a single wavelength, and acts through non-thermal or photochemical reactions in the cells [12]. Most laser systems used in LLLT studies are therapeutic lasers that operate in the red to infrared spectrum of light. Infrared laser light has been demonstrated to have a typical penetration depth of nearly 3 mm, whereas red laser light has a penetration depth of 1 mm. Therefore, infrared low-level laser therapy (IR-LLLT) has been applied to treat deep damaged tissues, such as the TMJ [13].

A wide range of photobiostimulatory effects of IR-LLLT has been reported, such as proliferation of macrophages (histiocytes) [14], lymphocytes [15], endothelial cells [16], and fibroblasts [17]. Many studies have also demonstrated analgesic and anti-inflammatory effects provided by IR-LLLT in both experimental [3,18,19] and clinical trials [1,20-23].

Analgesic, anti-inflammatory, and stimulatory effects of IR-LLLT on chronic joint disorders have been confirmed [13]. In addition, due to these biological properties, IR-LLLT has been successfully used to reduce the painful symptoms of TMDs [11,20-22,24-26], but the precise mechanism of such biological effects remains unclear.

Although it has been reported that IR-LLLT promotes an anti-nociceptive response in the orofacial formalin test carried out in the upper lip of rats [18], there is no study concerning its effects on the TMJ of experimental animals.

Therefore, the goal of this study was to assess the effect of infrared laser photobiomodulation on the formalin-induced nociceptive response and carrageenan-induced inflammation of the TMJ in rodents.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Animals

Experimental protocols were approved by the Ethics Committee on Research of the Tiradentes University (protocol 030609). Sixty male Wistar rats (250–300 g) from the Central Animal House of the Tiradentes University (Aracaju/Brazil) were used in this study – 15 of them were used for the evaluation of the anti-nociceptive response and 45 in the histological analysis. Animals were maintained in plastic cages at controlled room temperature (21 ± 2 °C) with free access to food and water, under a 12 h light/dark cycle. All the experimental procedures were carried out during the light period of the day (08:00 a.m. to 05:00 p.m.).

2.2 Evaluation of the nociceptive response

2.2.1 Formation of the experimental groups

The animals were randomly assigned into three experimental groups (n=5) as described in table 1. The intraperitoneal injection of saline solution and irradiation with 0 J/cm^2 were performed in order to ensure that all the animals were submitted to the same stressor conditions, regardless of the group. In addition, the intraperitoneal injections with diclofenac sodium (Voltaren® 75 mg/3 mL, Novartis Biociências S.A., São Paulo-SP-Brazil) or saline solution were performed 1 h prior to the nociception induced induction by 2.5% formalin.

Table 1: Formation of the experimental groups according to the treatment procedures.

2.2.2. Formalin injection

The nociceptive response in rats was induced by injection of 2.5% formalin in the TMJ of the rats. Prior to the formalin injection, the animals were briefly anesthetized by inhalation of halothane. Subsequently, the posteroinferior border of the right zygomatic arch was palpated and a needle (12.7 x 0.33 mm) of an insulin syringe was inserted immediately below this point and then advanced in the anterior direction until reaching

the posterolateral aspect of the condyle. Then, 50 μ L of the chemical agent was injected into the right TMJ [27].

2.2.3. Low-level laser therapy procedures

The irradiations procedures were performed transcutaneously in a single contact point, equivalent to the central portion of the right TMJ, immediately after the injection with formalin, using a GaAlAs Semiconductor Diode Laser (MMOptics ®-São Carlos-SP), in the infrared electromagnetic spectrum (IR), λ 780nm, beam area = 0.04 cm^2 . (Table 2).

Table 2. Description of low-level laser therapy parameters applied to the irradiated groups.

2.2.4. Measurement of behavioral nociceptive response

Following the TMJ formalin injections as well as the treatment procedures, the animals, recovered from the anesthesia, were returned to the test chamber for a 45 min observation period. The recording time was divided into blocks of 3 min and was quantified by: the time (seconds) that the rats spent rubbing the orofacial region asymmetrically with the ipsilateral fore or hindpaw. The occurrence of flinches with the head in an intermittent and reflexive way, characterized by high-frequency shakes of the head, was expressed as 1 second [28]. The different nociceptive behaviors were also evaluated together by their sum.

2.2.5 Measurement of plasma extravasation using Evan's blue dye

After the conclusion of each experiment, the animals were subjected to anesthesia with intraperitoneal injection of xylazine hydrochloride (10 mg/Kg, Anasedan - CEVA Sante Animale, Paulínia-SP, Brazil) and ketamine hydrochloride (25 mg/Kg, Dopalen -CEVA Sante Animale, Paulínia-SP, Brazil). The Evan's blue dye (0.1%, 5 mg/kg, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was administered systemically in order to confirm the TMJ injection site at *post-mortem*. The confirmation of the correct site of the injection was performed by the observation of plasma extravasation subsequently to the TMJ injection, indicated by the presence of the dye in the induced area.

2.3 Histological study of the inflammatory response of the TMJ

2.2.1 Formation of the experimental groups

The animals were randomly assigned into three experimental groups (n=15) as previously described in table 1 (see item 2.2.1). Each animal was anesthetized with intraperitoneal injection of xylazine hydrochloride (10 mg/Kg) and ketamine hydrochloride (25 mg/Kg) and had its right preauricular region shaven and cleaned with povidine-iodine solution for further chemical induction of inflammation. In the CRG and DFN groups, diclofenac sodium and saline solutions were injected intraperitoneally in rats 1 h after the inflammatory induction procedures of TMJ. The injections were repeated every 24 hours for a maximum period of seven days.

2.3.2 Induction of TMJ inflammation by Carrageenan injection

The induction of inflammation in rat TMJs was obtained by injecting 50 μ L of 1% carrageenan (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), diluted in saline solution. The injection procedures were performed as previously described for 2.5% formalin (see item 2.2.2).

2.3.3 Low-level laser therapy procedures

The LLLT parameters used in this step of the experiment were the same as described in item 2.2.3. The first irradiation of rat TMJ with LLLT was performed 1 h after the carrageenan injection and then 24 hours thereafter. Subsequently, the irradiation procedures were performed at 48-hour intervals for a maximum period of seven days.

2.3.4 Histological processing

At 24 h, and 3 and 7 days, five animals of each group (CRG, DFN, and LST) were euthanized in a carbon-dioxide chamber (100% CO₂, 5 min). The animals were then decapitated and the skin of the head was removed. Then the heads were fixed in buffered 10% formalin solution for seven days. Subsequently, the specimens were washed in running water and immersed in 10% nitric acid, which was exchanged every 24 hours. The location of the sectioning was set between the orbital cavity and the auditory conduct. The obtained samples were diaphanized in xylene, dehydrated in ethanol, and embedded in paraffin. Twenty sagittal 5- μ m thick histological sections were obtained and stained in hematoxylin-eosin for further examination using a light microscope.

2.3.4 Histological analysis

The histological sections were used to describe the inflammatory infiltrate, periarticular soft tissue edema, vessel congestion, alterations in the joint capsule, synovial lining hyperplasia, and changes in both the articular surface and disc. In

addition, a semiquantitative analysis of the intensity of the inflammatory response and newly formed capillary blood vessels in the periarticular soft tissue was performed according to the histological criteria described in Table 3.

Table 3. Criteria of histological evaluation of the articular capsule connective tissue.

2.4 Statistical analysis

2.4.1 Nociceptive analysis

Data with homogeneity of variance were analyzed using the one-way analysis of variance (ANOVA), and multiple post-hoc comparisons were performed using the Tukey test. A probability level of less than 0.05 was considered to indicate statistical significance. Data are presented in figures in text as means \pm SEM.

2.4.2 Histomorphological analysis

Data with homogeneity of variance were analyzed using the Kruskal-Wallis test, and multiple post-hoc comparisons were performed using the Dunn's multiple comparisons test. A probability level of less than 0.05 was considered to indicate statistical significance. Data are presented in figures in text as means \pm SD.

3. RESULTS

3.1 Anti-nociceptive evaluation

Injections into the TMJ of 2.5% formalin induced the nociceptive behavior characterized by flinching of the head and rubbing of the orofacial region. As shown in Fig. 1, the intraperitoneal administration of 10 mg/Kg of diclofenac sodium 1 hour prior to injection of 2.5% formalin significantly reduced the nociceptive behavior when analyzed together ($p<0.001$) and separately ($p<0.05$).

Fig. 1 – Evaluation of the anti-nociceptive response in the experimental groups: FRG, DFN and LST, considering the behaviors characterized by orofacial rubbing, head flinches, and by the sum of both behaviors. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ and *** $p<0.001$. DFN and LST are significantly different from FRG.

Low-level laser therapy at fluencies of 52.5 (LST group) significantly reduced the sum of nociceptive response used as an index of TMJ pain ($p<0.001$). Analyzed separately, LST group promoted a significant decrease in the nociceptive behavior expressed as both orofacial rubbing ($p<0.001$) and head flinching ($p<0.001$). In

addition, LST was found to be more successful in reducing the nociceptive behaviors than the administration of diclofenac sodium ($p<0.05$).

3.2 Histomorphological analysis

At 24 hours (Figure. 2), all groups exhibited inflammatory infiltrate ranging from moderate to intense, concentrated particularly in the retrodiscal region of the TMJ. In addition, they showed mild to moderate synovial hyperplasia, as well as articular villi formation. In the CRG group, the inflammatory infiltrate was composed by polymorphonuclear neutrophils (PMN) in association with scarce areas of liquefactive necrosis (microabscesses) and intense interstitial edema. On the periphery, extensive hemorrhagic areas were observed as well as intense venous congestion (passive hyperemia), and enlargement of the joint space. In the DFN group, in spite of the intense infiltrate of neutrophils observed throughout the retrodiscal connective tissue, presence of lymphocytes and histiocytes as well as intense passive hyperemia and neoformation of peripheral capillary blood vessels were seen in the peripheral region. In contrast, in the LST group, the inflammatory response consisted predominantly of lymphocytes and histiocytes, although occasional polymorphonuclear neutrophils could be seen. In the peripheral areas, there was marked proliferation of spindle-shaped cells (fibroblasts and angioblasts) and also neoformation of capillary blood vessels.

Fig. 2 – Histological sections (HE-stained) of the experimental groups at 24 h. (A – C) Articular space of the TMJ of CRG, DFN, and LST groups, respectively, showing the condyle head (cd), the articular disc (dc), and the temporal bone (tp). Note the enlargement of the articular space in CRG (two-headed arrow). (D – E) Retrodiscal area of the TMJ, showing (D) intense polymorphonuclear infiltrate in CRG (neutrophils in enlarged magnification), with microabscess formation (mAb); (E) lymphocytes and neutrophils infiltrate in DFN (lymphocytes in enlarged magnification); and (F) lymphocyte-rich infiltrate and immature granulation tissue (gt) in LST (fibroblasts in enlarged magnification). (G – I) Formation of articular villi in CRG, DFN, and LST, respectively.

At three days (Figure. 3), marked chronic inflammatory infiltrate was observed in the retrodiscal area in the CRG and DFN groups, even though the vascular content was most evident in the latter. However, the LST group showed exuberant granulation tissue with intense vascularization, proliferation of fibroblasts, and deposition of newly

formed collagen fibers. Synovial hyperplasia of the condyle head was clearly evident in the CRG and DFN groups, but it was not verified in the LST group. Moreover, villi were found in all three experimental groups, but they seemed to be the taller in the DFN and LST groups than in the CRG group.

Fig. 3 – Histological sections (HE-stained) of the experimental groups at 3 days. (A – C) Articular space of the TMJ of CRG, DFN, and LST groups, respectively, showing the condyle head (cd), the articular disc (dc), and the temporal bone (tp). (D-E) Retrodiscal area of the TMJ, showing (D) intense inflammatory infiltrate in CRG (lymphocytes in enlarged magnification); (E) lymphocytes infiltrate and highly vascularized granulation tissue in DFN (lymphocytes in enlarged magnification); and (F) fibroblast-rich granulation tissue and delicate collagen fibers in LST (fibroblasts in enlarged magnification). (G) Formation of short villi in CRG, while DFN and LST showed high villi.

At seven days (figure 4), the CRG group presented sparse chronic inflammatory cells and a few hyperemic capillary blood vessels. The retrodiscal area of the DFN group consisted of moderately collagenized and hypocellular connective tissue, displaying sparse hyperemic capillary blood vessels. In the LST group, the connective tissue was shown to be denser and exhibited no sign of persistent hyperemia capillary blood vessels. No remarkable histological alteration was observed in the articular fossa, except for a mild hyperplasia of the synovial membrane. Villi were verified in the three experimental groups, they were shown to be particularly marked in DFN and LST groups.

Fig. 4 – Histological sections (HE-stained) of the experimental groups at 7 days. (A – C) Articular space of the TMJ of CRG, DFN, and LST groups, respectively, showing the condyle head (cd), the articular disc (dc), and the temporal bone (tp). (D-E) Retrodiscal area of the TMJ, showing moderately collagenized and hypocellular fibrous connective tissue, displaying sparse hyperemic capillary blood vessels in CRG (D) and DFN (E), although the connective tissue was denser in LST (F). (G - I) The formation of articular villi was observed in CRG, DFN, and LST, respectively. (G) Discrete villi in CRG were observed, while in the DFN (H) and LST (I) the villi were particularly marked.

Figure 5 shows the comparative analyses of the intensity of the inflammatory response and vascularization in the three experimental groups over the time-course of the study. The intensity of inflammatory response was significantly lower in the LST group than in the CRG and DFN groups at 24 h ($p<0.001$), 3 days ($p<0.001$), and 7 days ($p<0.01$). Regarding the content of newly formed blood vessels, it was found that the LST group exhibited higher scores of vascularity than the CRG and DFN groups at 24 hours ($p<0.001$ and $p<0.01$) and three days ($p<0.001$ and $p<0.001$), but not at seven days ($p>0.05$).

Fig. 5 – Comparative analyses of the intensity of the inflammatory response and vascularization in the three experimental groups over the time-course of the study.
 $*p<0.05$, $** p<0.01$ and $*** p<0.001$. DFN and LST are significantly different from CRG.

4. DISCUSSION

TMDs are painful conditions that often present an inflammatory component [29]. In spite of the close relationship between TMD and inflammation, the anti-inflammatory effects of LLLT on the relief of the TMJ-related orofacial pain remain unclear. The role played by LLLT on the reduction of the inflammatory response in the TMJ of rats has been recently reported [3], but we present the first study associating anti-nociceptive and anti-inflammatory activity of LLLT in the TMJ of rats, using formalin and carrageenan experimental models.

Formalin is a noxious stimulus commonly used in animal behavioral experiments, which shows two distinct phases [28]. The early phase is a short-lasting response and represents the result of the direct stimulation of C-nociceptors. The second phase is a continuous and long-term response that mimics acute post-injury pain in humans and seems to reflect the activation of central sensitized neurons in response to peripheral inflammation as well as ongoing activity of primary afferents [28,30,31]. The orofacial formalin test is a well-established experimental model to assess the anti-nociceptive effect of drugs used in the control of pain of the facial region [28,31,32]. Therefore, this test was used in the current study to evaluate the anti-nociceptive effect of LLLT in the TMJ.

The LLLT protocol used in this study was effective in reducing the pain in both phases of the inflammatory induction elicited by formalin. Significant reduction of the painful symptoms and recovery of the mandibular movements of patients treated with

phototherapy was previously reported using the same equipment and protocol employed in the current study [33]. However, the precise mechanism underlying such anti-nociceptive effects has not yet been clarified. It has been previously demonstrated that the infrared laser irradiation with a similar fluency (50 J/cm^2) inhibited the prostaglandin (PGE_2) production in experimentally induced knee inflammation [19]. As PGE_2 is an important inflammatory marker, responsible for pain that accompanies the inflammatory process [34], it is possible that there is a relationship between the LLLT-induced block of the prostaglandin synthesis and the orofacial pain control observed in this study. Other possible explanations for the analgesic effect of LLLT include the release of β -endorphins, an increase in the patient's pain threshold, a reduction of the release of chemical mediators involved with the painful symptoms, and increased ATP production [23,35,36]. Additionally, it is considered that the pain observed in muscles and in the TMJ is associated with reduced blood flow and with the presence of local edema [35,37], thus it has been suggested that the positive effect of laser therapy including its analgesic property may be associated with its ability to stimulate the microcirculation in the irradiated tissue [38]. Such a stimulus, in turn, would result in alteration of the acidosis as well as removal of substances that promote pain [20].

Carrageenan is a pro-inflammatory polysaccharide widely used for induction of experimental inflammation in animal models, and is the most common method employed to assess of anti-inflammatory effects of drugs and other alternative methods of inflammation and pain control [39]. The successful utilization of this model to induce TMJ inflammation has been reported [27]. Therefore, in order to evaluate whether the anti-nociceptive effect promoted by LLLT was in fact related to an anti-inflammatory activity, we carried out a histological analysis of the TMJ using the experimental model of carrageenan as a flogistic agent. Moreover, diclofenac sodium was used as a positive control due to its ability to block cyclooxygenase isozymes involved in prostaglandin synthesis, with a consequent reduction in inflammation [40].

In this study, LLLT significantly reduced the intensity of the inflammatory response over the time-course of the experiment in LST compared to the CRG and DFN groups. A similar beneficial effect of LLLT on TMJ inflammation in rats has been recently reported [3]. The results might be related to a possible laser-induced inhibition of cyclooxygenase, especially COX-2, an isoenzyme responsible for the production of prostaglandins, particularly PGE_2 , from arachidonic acid [34,41]. These biochemical

mediators are involved in the development of the vascular events during the inflammatory process of joints [19,42].

Furthermore, LLLT promoted a marked decrease of the PMN infiltrate and enhanced the lymphocyte content within the injured TMJ tissues at the first two phases of the experiment (24 h and three days). Similar histological findings using infrared laser irradiation on the TMJ has recently been reported [3]. The lower content of PMN induced by infrared LLLT might have resulted in the inhibition of the prostaglandin synthesis, which would have ultimately reduced the influx of these cells into the injured area [34,41]. On the other hand, as previous studies have demonstrated that infrared laser irradiation enhances the ATP levels in lymphocytes, it is possible that the earlier replacement of PMN by these chronic inflammatory cells might result in an increased metabolic activity. These histological data suggest that infrared LLLT promoted earlier chronification of the inflammatory response, accelerating the events related to the healing process.

Another noteworthy histological finding observed in this study was the LLLT-induced increased vascularization in the retrodiscal area. In fact, IR-LLLT has been previously demonstrated to directly stimulate vascular endothelial cell proliferation *in vitro* [16]. Moreover, IR-LLLT may display stimulatory effects on lymphocytes to produce growth factors that can modulate endothelial cell proliferation *in vitro* [43]. The high rates of newly formed capillary blood vessels observed in LST suggest the improvement of the granulation tissue, which is considered the first step of the healing process [15,44,45].

It should be noted that the initiation of the granulation reaction depends crucially on the chronification of the inflammatory response, since vascular neoformation is associated with the release of growth factors (e.g., VEGF, PDGF) derived from lymphocytes and histiocytes [46]. Therefore, it is possible that IR-LLLT not only modulated important steps of the inflammatory response, but also stimulated biological events associated with the healing process.

We demonstrated that both anti-nociceptive and anti-inflammatory effects of IR-LLLT were more noticeable expressive than those presented by diclofenac sodium. These data are likely related to the fact that although this drug is widely recognized as an inhibitor of cyclooxygenase isozymes, displaying analgesic/anti-inflammatory activity [40], it is not thought to act as a biostimulatory molecule of other biological events involved in the inflammatory dynamics.

In conclusion, we demonstrate that IR-LLLT promoted a significant reduction of the nociceptive response resulting from the experimental injection of formalin in the TMJ of rats. Furthermore, our histological observations suggest that such activity might be related to a possible modulation of the inflammatory response and earlier initiation of biological events associated with the healing process.

References

- [1] S.C. Núñez, A.S. Garcez, S.S. Suzuki, M.S. Ribeiro. Management of mouth opening in patients with temporomandibular disorders through low-level laser therapy and transcutaneous electrical neural stimulation. *Photomed. Laser Surg.* 24 (2006) 45-49.
- [2] S.F. Dworkin, H.K. Huggins, L. LeResche, J. Von Korff, E. Truelove; E. Sommers. Epidemiology of signs and symptoms in temporomandibular disorders: clinical signs in cases and controls. *J. Am. Dent. Assoc.* 120 (1990) 273-81.
- [3] C. M. Carvalho, J.A. Lacerda, F. P. Santos Neto, I.C.V. Castro, T.A. Ramos, F.O. Lima, J.G. de C. Luz, M. J. P. Ramalho, J.N. dos Santos, A.L.B. Pinheiro. Evaluation of Laser Phototherapy in the inflammatory process of the rat's TMJ Induced by carrageenan. *Photomed. Laser Surg.* 29 (2011) 245-254.
- [4] E. Ting, R.C. Roveroni, L.F. Ferrari, C.M. Loutufo, M.C. Veiga, C.A. Parada, C.H. Tambeli. Indirect mechanism of histamine-induced nociception in temporomandibular joint of rats. *Life Sci.* 81(2007) 765-71.
- [5] B. Bagis, E.A. Ayaz, S. Turgut, R. Durkan, M. Özcan. Gender difference in prevalence of signs and symptoms of temporoman-dibular joint disorders: a retrospective study on 243 consecutive patients. *Int. J. Med. Sci.* 9 (2012) 539-544.
- [6] P.C. Gotzsche. Non-steroidal anti-inflammatory drugs. *BMJ.* 320 (2000) 1063-1070.
- [7] H.G. Schaible, A. Ebersberger, G.S. Von Banchet. Mechanisms of pain in arthritis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 966 (2002) 343-354.
- [8] M. Lazzaroni, P.G. Bianchi. Gastrointestinal side effects of traditional non-steroidal anti-inflammatory drugs and new formulations. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 20 (2004) 48-58.
- [9] M.E. Farkouh, J.D. Greenberg, R.V. Jeger, K. Ramanathan, F.W. Verheugt, J.H. Chesebro, H. Kirshner, J.S. Hochman, C.L. Lay, S. Ruland, B. Mellein, P.T. Matchaba, V. Fuster, S.B. Abramson. Cardiovascular outcomes in high risk patients with osteoarthritis treated with ibuprofen, naproxen or lumiracoxib. *Ann. Rheum. Dis.* 66 (2007) 764-70.
- [10] C. Mcneill. History and evolution of TMD concepts. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 83 (1997) 51-60.
- [11] T. Dostalová, P. Hlináková, M. Kasperová, A. Reháček, L. Vavricková, L. Navrátil. Effectiveness of physiotherapy and GaAlAs laser in the management of temporomandibular joint disorders. *Photomed. Laser Surg.* 30 (2012) 275-280.
- [12] T. Karu. Photobiological fundamentals of low power laser therapy. *IEEE J. Quantum. Electron.* 23 (1987) 1703-18.

- [13] J.M. Björdal, C. Couppé, R.T. Chow, J. Tunér, E.A.A. Ljunggren. Systematic review of low level laser therapy with location-specific doses for pain from chronic joint disorders. *Aust. J. Physiother.* 49 (2003) 107-116.
- [14] A. Dube, H. Bansal, P.K. Gupta. Modulation of macrophage structure and function by low level He-Ne laser irradiation. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2 (2003) 851-5.
- [15] M.A.G. Ribeiro, R.L.C. Albuquerque Jr., L.M.P. Ramalho, A.L.B.P. Pinheiro, L.R. Bonjardim, S.S. Da Cunha. Immunohistochemical assessment of myofibroblasts and lymphoid cells during wound healing in rats subjected to laser photobiomodulation at 660 nm. *Photomed. Laser Surg.* 27(2009) 49-55.
- [16] P. Moore, T.D. Ridgway, R.G. Higbee, E.W. Howard, M.D. Lucroy. Effect of wavelength on low-intensity laser irradiation-stimulated cell proliferation in vitro. *Lasers Surg. Med.* 36 (2005) 8-12.
- [17] M. Kreisler, A.B. Christoffers, B. Willershausen, B. d'Hoedt. Effect of low-level GaAlAs laser irradiation on the proliferation rate of human periodontal ligament fibroblasts: an in vitro study. *J. Clin. Periodontol.* 30 (2003) 353-8.
- [18] J.L. Zeredo, K.M. Sasaki, Y. Takeuchi, K. Toda. Antinociceptive effect of Er:YAG laser irradiation in the orofacial formalin test. *Brain Res.* 1032 (2005) 149-153.
- [19] R.C. Pallotta, J.M. Björdal, L. Frigo, E.C.P. Leal Junior, S. Teixeira, R.L. Marcos, L. Ramos, F. de M. Messias, R.A.B. Lopes-Martins. Infrared (810-nm) low-level laser therapy on rat experimental knee inflammation. *Lasers Med. Sci.* 27 (2012) 71-78.
- [20] K. Mizutani, Y. Musya, K. Wakae, T. Kobayashi, M. Tobe, K. Taira, T. Harada. A clinical study on serum prostaglandin E2 with low-level laser therapy. *Photomed. Laser Surg.* 22 (2004) 537-539.
- [21] M.T. Kato, E.M. Kogawa, C.N. Santos, P.C.R. Conti. Tens and low-level laser therapy in the management of temporomandibular disorders. *J. Appl. Oral Sci.* 14 (2006) 130-135.
- [22] H. Fikácková, T. Dostálková, L. Navrátil, J. Klaschka, Effectiveness of Low-Level Laser Therapy in Temporomandibular Joint Disorders: A Placebo-Controlled Study. *Photomed. Laser Surg.* 25 (2007) 297-303.
- [23] M.O. Mazzetto, T.H. Hotta, R.C.A. Pizzo. Measurements of Jaw Movements and TMJ Pain Intensity in Patients Treated with GaAlAs Laser. *Braz. Dent. J.* 21 (2010) 356-360.
- [24] A.L.B. Pinheiro, E.T. Cavalcanti, T.I.T.N.R. Pinheiro, M.J.P.C. Alves, C.T.A. Manzi. Low-level laser therapy in the management of disorders of the maxillofacial region. *J Clin. Laser Med. Surg.* 15 (1997) 181-183.
- [25] A.L.B. Pinheiro, E.T. Cavalcanti, T.I.T.N.R. Pinheiro, M.J.P.C. Alves, E.R. Miranda, A.S.de Quevedo, C.T.A. Manzi, A.L.B. Vieira, A.B. Rolim. Low-level laser therapy is an important tool to treat disorders of the maxillofacial region. *J. Clin. Laser Med. Surg.* 16 (1998) 223-226.
- [26] C.M. Carvalho, J.A. de Lacerda, F.P. dos Santos Neto, M.C.T. Cangussu, A.M.C. Marques, A.L.B. Pinheiro. Wavelength effect in temporomandibular joint pain: a clinical experience. *Lasers Med. Sci.* 25 (2010) 229-232.
- [27] A.C. Goulart, F.A. dos S. Correia, S.C.O.M. de Sousa, J.G. de C. Luz. Study of the inflammatory process induced by injection of carrageenan or formalin in the rat temporomandibular joint. *Braz. Oral Res.* 19 (2005) 99-105.

- [28] R.C. Roveroni, C.C. Parada, M.C.F.A. Veiga, C.H. Tambeli. Development of a behavioral model of TMJ pain in rats: the TMJ formalin test. *Pain*. 94 (2001) 185-91.
- [29] J.R. Fricton. The relationship of temporomandibular disorders and fibromyalgia: Implications for diagnosis and treatment. *Curr. Pain Headache Rep.* 8 (2004) 355-63.
- [30] R. Dallel, P. Raboisson, P. Clavelou, M. Saade, A. Woda. Evidence for a peripheral origin of the tonic nociceptive response to subcutaneous formalin. *Pain*. 61 (1995) 11-16.
- [31] A. Capuano, A. De Corato, M. Treglia, G. Tringali, C.D. Russo, P. Navarra. Antinociceptive activity of buprenorphine and lumiracoxib in the rat orofacial formalin test: A combination analysis study. *European Journal of Pharmacology*. 605 (2009) 57-62.
- [32] P. Raboisson, R. Dallel. The oral facial formalin test. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 28 (2004) 219-226.
- [33] M.A.M.R. da Silva, A.L. Botelho, C.V. Turim, A.M.B.R. da Silva. Low level laser therapy as an adjunctive technique in the management of temporomandibular disorders. *Cranio*. 30 (2012) 264-271.
- [34] P. de. Almeida, R.A.B. Lopes-Martins, S.S. Tomazoni, G.M. Albuquerque-Pontes, L.A. Santos, A.A. Vanin, L. Frigo, R.P. Vieira, R. Albertini, P. de T.C. de. Carvalho, E.C.P. LEAL-JUNIOR. Low-Level Laser therapy and sodium diclofenac in acute inflammatory response induced by skeletal muscle trauma: effects in muscle morphology and mRNA gene expression of inflammatory markers. *Photochem. Photobiol.* 89 (2013) 501-507.
- [35] Z. Simunovic. Low level laser therapy with trigger points technique: a clinical study on 243 patients. *J. Clin. Laser Med. Surg.* 14 (1996) 163-167.
- [36] M.O. Mazzetto, T.G. Carrasco, E.F. Bidinelo, R.C. de A. Pizzo, R.G. Mazzetto. Low intensity laser application in temporomandibular disorders: a phase I double-blind study. *Cranio*. 25 (2007) 186-192.
- [37] M. Tullberg, P.J. Alstergren, M.M. Ernberg, Effects of low-power laser exposure on masseter muscle pain and microcirculation. *Pain*. 105 (2003) 89-96.
- [38] A.L.B. Pinheiro, F.A. Limeira Júnior, M.E.M. Gerbi, L.M.P. Ramalho, C. Marzola, E.A.C. Ponzi. Effect of low level laser therapy on the repair of bone defects grafted with inorganic bovine bone. *Braz. Dent. J.* 14 (2003) 177-181.
- [39] M. Peter-Szabo, G. Kekesi, E. Nagy, E. Sziver, G. Benedek, G. Horvath. Quantitative characterization of a repeated acute joint inflammation model in rats. *Clin. Exp. Pharmacol. P.* 34 (2007) 520-526.
- [40] K. Ma, M. Yiqun, T. Wu, W. Wang, L. Xiaoming, H. Xiaohui, W. Yingwei. Efficacy of Diclofenac Sodium in Pain Relief after Conventional Radiofrequency Denervation for Chronic Facet Joint Pain: A Double-Blind Randomized Controlled Trial. *Pain Med.* 12 (2011) 27-35.
- [41] P. de. Almeida, R.A.B. Lopes-Martins, S.S. Tomazoni, J.A. Silva Jr, P. de T.C. de Carvalho, J.M. Björdal, E.C.P. Leal-Junior. Low-level Laser therapy improves skeletal muscle performance, decreases skeletal muscle damage and modulates mRNA expression of COX-1 and COX-2 in a dose-dependent manner. *Photochem. Photobiol.* 87 (2011) 1159-1163.
- [42] F. Ozdemir, M. Birtane, S. Kokino. The Clinical Efficacy of Low-Power Laser Therapy on Pain and Function in Cervical Osteoarthritis. *Clin. Rheumatol.* 20 (2001) 181-184.

- [43] A.D. Agaiby, L.R. Ghali, R. Wilson, M. Dyson. Laser modulation of angiogenic factor production by T-lymphocytes. *Lasers Surg. Med.* 26(2000) 357-63.
- [44] M.A.G. Ribeiro, R.L.C. Albuquerque Jr., A.L.S. Barreto, V.G.O. Moreno, T.B. Santos, C.D.F. Dantas. Morphological analysis of second-intention wound healing in rats submitted to 16 J/cm² e 660-nm laser irradiation. *Indian J. Dent. Res.* 20 (2009) 390.
- [45] M.D.M. Dantas, D.R.R. Cavalcante, F.E.N. Araújo, S.R. Barreto, G.T.S. Aciole, A.L.B. Pinheiro, M.A.G. Ribeiro, I.B. Lima-Verde, C.M. Melo, J.C. Cardoso, R.L.C. Albuquerque Jr. Improvement of dermal burn healing by combining sodium alginate/chitosan-based films and low level laser therapy. *J. Photochem. Photobiol. B.* 105 (2011) 51-59.
- [46] V. Kumar, A.K. Abbas, N. Fausto, J.C. Aster. Inflamação Aguda e crônica. In. _____. Robbins e Cotran. Patologia-Bases Patológicas das Doenças. Editora Elsevier, Rio de Janeiro, 2010, pp.43-79.

ANEXO D: NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA JOURNAL OF PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY B: BIOLOGY

JOURNAL OF PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY B: BIOLOGY AUTHOR INFORMATION PACK



Introduction

The Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology (JPPB) welcomes Invited review articles and original papers not previously published

The journal provides a forum for the publication of papers relating to the various aspects of photobiology, as well as a means for communication in this multidisciplinary field. The scope includes:

- bioluminescence
- chronobiology
- DNA repair
- environmental photobiology
- nanotechnology in photobiology
- photocarcinogenesis
- photochemistry of biomolecules
- photomedicine
- photomorphogenesis
- photomovement
- photoreception
- photosensitization
- photosynthesis
- phototechnology
- spectroscopy of biological systems
- UV and visible radiation effects
- vision

This journal is cited by the following Abstracting Services: BIOSIS, Cambridge Scientific Abstracts, Chemical Abstracts, Current Contents, Elsevier BIOBASE/Current Awareness in Biological Sciences, EMBASE/Excerpta Medica, Embilogy, Engineering Index, Medlar's System, Metals Abstracts, PASCAL/CNRS, Physics Abstracts, Physikalische Berichte, Polymer Contents, Research Alert™, Science Citation Index, Scopus.

Contact Details for Submission

Authors are requested to submit their article to the Editor responsible for the topic involved:
Dr. Laszlo Matyus: Biophysics, Biomolecular spectroscopy, Photodynamic Therapy, Dermatology, Photomedicine.

Dr. Robert Carpentier: Photosynthesis, Environmental photobiology, Photosensitisers, Oxygen radicals, DNA repair, UV/VIS effects.



Before You Begin

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: http://elsevier6.custhelp.com/app/answers/detail/a_id/286/p/7923/.

Submission declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

This journal offers authors a choice in publishing their research: Open Access and Subscription.

For Subscription articles
Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <http://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement. Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

For Open Access articles
Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <http://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights. For more information on author rights for:
 Subscription articles please see <http://www.elsevier.com/authorsrights>.
 Open access articles please see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open Access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
 - An Open Access publication fee is payable by authors or their research funder
- Subscription**
- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our access programs (<http://www.elsevier.com/access>)
 - No Open Access publication fee

All articles published Open Access will be immediately and permanently free for everyone to read and download. Permitted reuse is defined by your choice of one of the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution (CC BY): lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike (CC BY-NC-SA): for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text and data mine the article, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation, and license their new adaptations or creations under identical terms (CC BY-NC-SA).

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND): for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

To provide Open Access, this journal has a publication fee which needs to be met by the authors or their research funders for each article published Open Access. Your publication choice will have no effect on the peer review process or acceptance of submitted articles.

The publication fee for this journal is **\$3300**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop <http://webshop.elsevier.com/languageediting/> or visit our customer support site <http://support.elsevier.com> for more information.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

For submitting your manuscript to JPPB please go to our Elsevier Editorial System (EES) Website at: <http://ees.elsevier.com/jphotochem/> For technical support during the submission process, please visit www.elsevier.com/submissionsupport. For general questions, contact Dr. Robert Carpentier (Robert.Carpentier@uqtr.ca), Dr. Laszlo Matyus (lmatyus@med.unideb.hu), or Dr. Dominic Robinson (d.robinson@erasmusmc.nl).

Referees

Please submit, with the manuscript, the names and addresses of 5 potential referees. The referees should not be editorial board members or from the same institute or geographical region as the authors.



Preparation

Use of wordprocessing software

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your wordprocessor.

LaTeX

If the LaTeX file is suitable, proofs will be produced without rekeying the text. The article should preferably be written using Elsevier's document class 'elsarticle', or alternatively any of the other recognized classes and formats supported in Elsevier's electronic submissions system, for further information see <http://www.elsevier.com/wps/find/authorsview.authors/latex-ees-supported>. The Elsevier 'elsarticle' LaTeX style file package (including detailed instructions for LaTeX preparation) can be obtained from the Quickguide: <http://www.elsevier.com/latex>. It consists of the file: elsarticle.cls, complete user documentation for the class file, bibliographic style files in various styles, and template

files for a quick start. For information about reference management please go to the document at http://cdn.elsevier.com/assets/pdf_file/0011/109388/elsdoc.pdf and click on the section 'bibliography'.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

A Graphical abstract is optional and should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 x 1328 pixels (h x w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 x 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples. Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Nomenclature and Units

Nomenclature and units. Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). The only exception is the use of min, h, d and a as units for elapsed time, though never when combined algebraically with other units. If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. Consult the IUPAC "Glossary of Terms Used in Photochemistry" for the correct terminology (source: The Spectrum, Bowling Green, Vol.16, 1, 2003, p 16), (online: www.bgsu.edu/departments/photochem), (cited link: http://www.aspjournal.com/auth_instruct.html) UV ranges. The official UV ranges as defined by the CIE must be used:
 UV-A: 400-315nm
 UV-B: 315-280nm
 UV-C: 280-100nm

Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list. Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Artwork

Electronic	artwork
General	points
• Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.	
• Embed the used fonts if the application provides that option.	
• Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.	
• Number the illustrations according to their sequence in the text.	
• Use a logical naming convention for your artwork files.	
• Provide captions to illustrations separately.	
• Size the illustrations close to the desired dimensions of the printed version.	
• Submit each illustration as a separate file.	
A detailed guide on electronic artwork is available on our website: http://www.elsevier.com/artworkinstructions	

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format. Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):
 EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.
 TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.
 TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.
 TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please	do	not:
• Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;		
• Supply files that are too low in resolution;		
• Submit graphics that are disproportionately large for the content.		

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Text graphics

Text graphics may be embedded in the text at the appropriate position. If you are working with LaTeX and have such features embedded in the text, these can be left. See further under Electronic artwork.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Reference management software

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to wordprocessing packages, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style which is described below.

Reference Style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual Authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

Example: "..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result...."

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the

text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] B.K. Armstrong, A. Kricker, The epidemiology of UV induced skin cancer, *J. Photochem. Photobiol.*

B 63 (2001) 8-18.

Reference to a book:

[2] W. Strunk Jr., E.B. White, *The Elements of Style*, third ed., Macmillan, New York, 1979.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] G.R. Mettam, L.B. Adams, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*, E-Publishing, Inc., New York, 1994, pp. 281-304.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:
 • E-mail address
 • Full postal address
 • Phone numbers
 All necessary files have been uploaded, and contain:
 • Keywords
 • All figures (including title, figure captions)
 • All tables (including title, description, footnotes)

- Further considerations
- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
 - References are in the correct format for this journal
 - All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
 - Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
 - Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
 - If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes
- For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.



After Acceptance

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal Physics Letters B):

<http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Proofs

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from <http://get.adobe.com/reader>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/reader/tech-specs.html>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately – please let us have all your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail (the PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use). For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints/myarticleservices/booklets>).



Author Inquiries

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission) please visit this journal's homepage. For detailed instructions on the preparation of electronic artwork, please visit <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You can also check our Author FAQs at <http://www.elsevier.com/authorFAQ> and/or contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.