



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

ANDRÉ LUIZ CUNHA CAVALCANTE

**PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES NMDA NA VIA NOCICEPTIVA
TRIGEMINAL E O EFEITO MODULADOR DO MAGNÉSIO, NO MODELO
DE ARTRITE DA ARTICULAÇÃO TEMPOROMANDIBULAR INDUZIDA
POR CARRAGENINA EM RATOS**

FORTALEZA

2012

ANDRÉ LUIZ CUNHA CAVALCANTE

**PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES NMDA NA VIA NOCICEPTIVA
TRIGEMINAL E O EFEITO MODULADOR DO MAGNÉSIO, NO MODELO
DE ARTRITE DA ARTICULAÇÃO TEMPOROMANDIBULAR INDUZIDA
POR CARRAGENINA EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Mariana Lima Vale.

FORTALEZA

2012

ANDRÉ LUIZ CUNHA CAVALCANTE

**PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES NMDA NA VIA NOCICEPTIVA
TRIGEMINAL E O EFEITO MODULADOR DO MAGNÉSIO, NO MODELO
DE ARTRITE DA ARTICULAÇÃO TEMPOROMANDIBULAR INDUZIDA
POR CARRAGENINA EM RATOS.**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Aprovada em: 27 /01 / 2012

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Mariana Lima Vale (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará-UFC

Prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães
Universidade Federal do Ceará-UFC

Profa. Dra. Aline Alice Cavalcante de Albuquerque
Universidade Estadual do Ceará-UECE

Dedico este trabalho à minha família e aos meus grandes amigos e a Deus, de onde tiro todo o apoio e motivação necessários.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a Deus, a toda minha família e especialmente à minha orientadora Mariana Lima Vale.

À minha orientadora, Mariana Lima Vale, gostaria de agradecer por toda confiança e apoio depositados em mim, além de todo conhecimento e ensinamentos que me foram acrescentados.

Ao Prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães e Profa. Dra. Aline Alice Cavalcante de Albuquerque, pela disponibilidade, por aceitarem participar da minha banca de dissertação, além de adicionarem críticas altamente construtivas ao trabalho.

À Profa. Dra. Gerly Anne de Castro Brito pela contribuição para realização do estudo histopatológico.

Ao Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá e à Josiane Quetz pela colaboração nos estudos e análises experimentais, especialmente em relação aos estudos com PCR.

Aos Professores Doutores Ronaldo de Albuquerque Ribeiro e Marcellus Henrique Loila Ponte de Souza pela colaboração em relação à construção do trabalho.

À Profa. e amiga Delane Gondim, por me ajudar em várias etapas dos experimentos e na escrita do trabalho.

À técnica Maria Silvandira (Vandinha) pela contribuição na operação do trabalho e disponibilidade.

Aos meu pais Francisco de Assis Costa Cavalcante e Edna Maria Cunha Cavalcante e aos meus irmãos Eduardo, Júnior e Renata e às minhas cunhadas por me apoiarem sempre durante todo mestrado, pela dedicação em minha formação, celebrando cada conquista. Por todo o carinho, atenção, cuidado que, sempre, me fez sentir inspirado e renovado para me dedicar aos meu trabalhos, fazendo destes um fardo mais leve.

À minha namorada, grande amiga e parceira, Rafaelly Siqueira, pelos imensuráveis esforços dedicados a me ajudar em meu trabalho, sempre com otimismo e palavras de suporte, ou com idéias que engrandeceram ainda mais a pesquisa e os experimentos, além de tudo, propiciando bons e inesquecíveis momentos de felicidade e descontração, que, dessa forma, aliviava-me o peso das responsabilidades.

A todos os amigos de mestrado, Maria Isabel Azevedo, Ana Paula Fragoso, Cerqueira Gil que me deram força, dicas e apoio durante a pesquisa. À Joana Araujo que também, imensamente, ajudou-me nos experimentos, estando sempre disponível a desenvolver a pesquisa e tornando-se, também, grande companheira de trabalho.

A CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.

RESUMO

Entendendo a importância do papel dos receptores NMDA e do magnésio como modulador desse receptor no processo nociceptivo, nos propomos a estudar a importância do efeito desse receptor nas dores orofaciais originadas pela inflamação da ATM, mediada pela via trigeminal, analisando também o papel do magnésio o qual é um modulador da ativação desse receptor. Foi avaliado o parâmetro comportamental de nocicepção, pelo teste de hipernocicepção mecânica por von Frey eletrônico, sendo medido o limiar nociceptivo antes da injeção de carragenina e após (4,6,10, 24 – 168h). O antagonista dos receptores NMDA, MK-801 (0,1 ; 0,5 e 0,25mg/kg) foi utilizado para determinar o grau de influencia do receptor NMDA, sendo administrado por via intra-peritoneal (i.p.) 30 min antes da injeção de carragenina (Cg). Para determinar o papel do magnésio foi realizado um pré-tratamento através de uma suplementação com cloreto de magnésio ($MgCl_2$, 90 mg/kg, dividido em 2 tomadas por via oral), durante 3, 5 e 7 dias. Também provocamos uma deficiência de magnésio através da administração de uma dieta especial livre de magnésio e água mili-Q administrados *ad-libidum* por 9 dias. O limiar nociceptivo foi medido antes e depois de todos os tratamentos. Resultados: o pré-tratamento com o MK-801 (0,1 – 0,5mg/kg) inibiu a hipernocicepção, aumentando o limiar nociceptivo em 83% no pico de hipernocicepção (6ª hora) ($p<0.01$), tendo seu efeito se prolongado até 120 horas após uma única administração (16%; $p<0.05$). Com relação ao tratamento com suplementação com $MgCl_2$, observou-se que houve um aumento significativo no limiar nociceptivo em 24% no pico de hipernocicepção (6ª hora) dos animais que receberam $MgCl_2$ durante 3 dias antes da injeção de carragenina, ($p<0.001$), um aumento em 56% no grupo com pré-tratamento com 5 dias (6ª hora) ($p<0.001$) e um aumento de 65% no grupo que recebeu o $MgCl_2$ por 7 dias. No grupo depletado de magnésio tivemos um aumento na resposta nociceptiva quando comparado com o limiar inicial, havendo uma diminuição de 18% ($p<0,001$) nesse limiar. Os animais deficientes de magnésio e injetados com carragenina apresentaram uma diminuição persistente no limiar de hipernocicepção. Também observou-se que o nível plasmático do magnésio foi significativamente maior em todos os grupos tratados, subindo até 154% no 7º dia, quando comparado aos valores basais, e na deficiência, os níveis de magnésio após 9 dias chegou a ser 27% menor, comparando com o controle. Foi avaliado também a expressão relativa a subunidades NR1, NR2 e NR3 do receptor NMDA, através da análise de RT-PCR, na qual verificamos um aumento na expressão dos subtipos NR1 e NR3 ($p<0.05$) e uma diminuição da NR2B ($p<0.05$) nos grupos que receberam a suplementação com $MgCl_2$. Em relação aos animais deficientes de magnésio, esses não apresentaram mudança na subunidade NR2B, mas observou-se um aumento na subunidade NR1 e NR3 ($p<0.05$). Pelos achados de imunohistoquímica podemos sugerir que a deficiência de magnésio causou um aumento na imuno-marcação da subunidade NR1 fosforilada tanto no grupo que recebeu salina intra-articular como no grupo que recebeu carragenina intra-articular. Já em relação ao parâmetro inflamatório de intensidade de influxo celular, observou-se um aumento significativo no número de células na 6ª , tendo uma diferença mais significativa na 12ª hora ($p<0,01$). Observamos, com esse estudo, que o receptor NMDA possui um efeito importante na nocicepção orofacial e que o magnésio é capaz de modular o comportamento nociceptivo e induz rearranjos nas subunidades desse receptor na região Sp5C. Este estudo levar à um melhor compreensão do processamento central da via nociceptiva trigeminal e o desenvolvimento de novas abordagens no tratamento da dor orofacial de origem da ATM.

Palavras-chave: receptores NMDA; magnésio; articulação temporomandibular; artrite; dor; orofacial; inflamação

ABSTRACT

Understanding the role of NMDA receptors and magnesium as a modulator of this receptor in the nociceptive process, we propose to study the importance of the effect of this receptor in orofacial pain caused by the TMJ inflammation, mediated via trigeminal, also analyzing the role of the magnesium which is a modulator of activation of this receptor. Nociceptive behavioral parameter was evaluated, the mechanical hypernociception was analyzed by von Frey electronic, nociceptive threshold was measured before and after injection carrageenan (4,6,10, 24 - 168 hours). The NMDA receptor antagonist, MK-801 (0.1 to 0.5 mg / kg) was used to determinate the NMDA receptor influence in nociceptive process, it was administered intraperitoneally intraperitoneally (i.p.) 30 min before carrageenan Cg injection. To determinate the role of magnesium was carried out a pre-treatment by a supplementation with magnesium chloride (MgCl₂, 90 mg / kg, divided into two taken orally) for 3, 5 and 7 days. We also cause a magnesium deficiency by administration of a special diet free of magnesium and milli-Q water administered ad libitum for 9 days. The nociceptive threshold was measured before and after all treatments. Results: Pretreatment with MK-801 (1, 0.5 and 0.25mg/kg) inhibited the hypernociception, increasing the nociceptive threshold at 83% at the peak of hypernociception (6th hour) (p <0.01), and its effect lasted until 120 hours after a single administration (16%, p <0.05). With respect to treatment with supplemental MgCl₂, it was observed that there was a significant increase in the nociceptive threshold about 24% at the peak of hypernociception (6th hour) in animals that received MgCl₂ for 3 days before injection of carrageenan (p <0.001), an increase from 56% in animals with pre-treatment with 5 days (6th hour) (p <0.001) and an increase of 65% in the group that received MgCl₂ for 7 days. In the magnesium deficient group we observed an increase in nociceptive response when compared with the initial threshold, with a decrease of 18% (p <0.001) in that threshold. Animals deficient in magnesium and injected with carrageenan showed a persistent decrease in hypernociceptive threshold that last until the end of experiment. We also observed the plasma level of magnesium, it was significantly higher in all MgCl₂ treated groups, rising to 154% by day 7 compared to baseline, and in the deficient group, magnesium levels decreased its levels in 27% after 9 days of magnesium free diet compared with the control. We also evaluate the expression of NMDA subunits NR1, NR2 and NR3 by RT-PCR analysis, which we found an increased expression of NR1 and NR3 subtypes (p <0.05) and a decrease in NR2B (p <0.05) in the groups receiving supplementation with MgCl₂. For animals magnesium deficient, we observed no change in the NR2B subunit, but there was an increase in NR1 and NR3 subunit (p <0.05). By immunohistochemistry findings we suggest that magnesium deficiency caused an increase in immuno-labeling of NR1 phosphorylated in both group, treated with intra-articular saline and the group injected with intra-articular carrageenan. In relation to inflammatory parameter the intensity of cell influx showed significant increase in the numbers of cells at 6^a hour, having a more significant difference at 12^a hour (p <0.01). We observed, with this study, that the NMDA receptor has an important role in orofacial nociception and that magnesium is able to modulate the nociceptive behavior and induces rearrangements of subunits receptor in Sp5C region. This study could lead to a better understanding of the central processing of trigeminal nociceptive pathway and development of new approaches in the treatment of orofacial pain of TMJ origin.

Keywords: NMDA; magnesium; Temporomandibular joint; arthritis; pain; orofacial; inflammation.

LISTA DE FIGURAS

1	Representação esquemática da via nociceptiva trigeminal e da região de entrada dos aferentes primários	17
2	Desenho esquemático do receptor NMDA.....	26
3	Modelo demonstrando a conformação dos subtipos de receptores NMDA.....	27
4	Procedimento de injeção da carragenina.....	42
5	Localiação estereotóxica do subnúcleo caudal.....	44
6	Esquema ilustrativo do protocolo experimental de suplementação com o Cloreto.. de magnésio (MgCl ₂).....	46
7	Evolução temporal do efeito hipernociceptivo da artrite induzida por carragenina da ATM.....	52
8	Cinética da intensidade de influxo celular induzida pela carragenina na cavidade articular da ATM de ratos.....	54
9	Avaliação do efeito antihipernociceptivo do antagonista do receptor NMDA, MK-801, em artrite induzida por carragenina na ATM.	56
10	Efeito antihipernociceptivo do cloreto de magnésio (MgCl ₂) na artrite induzida por carragenina na ATM.....	58
11	Evolução temporal do efeito antihipernociceptivo do Cloreto de Magnésio (MgCl ₂) na artrite induzida por carragenina na ATM de ratos.....	59
12	Efeito da deficiência de magnésio (9 dias) na hipernocicepção induzida por carragenina.....	61
13	Fotomicrografia da subunidade NR1 fosofrilada.....	63
14	Expressão quantitativa relativa de RNAm dos subtipos R-NMDA NR1 (NMDA1), NR2B (NMDA2) e NR3 (NMDA3) em amostras do subnúcleo caudal de ratos artríticos tratados com cloreto de magnésio.....	66
15	Expressão quantitativa relativa de RNAm dos subtipos R-NMDA, NR1 (NMDA1), NR2B (NMDA2) e NR3 (NMDA3) em amostras do subnúcleo caudal de ratos artríticos com deficiência de magnésio.....	67
16	Ilustração hipotética do mecanismo de alteração da expressão das subunidades NR3 e NR2B dos receptores NMDA pela deficiência de magnésio e suplementação com MgCl ₂	88

LISTA DE ABREVIATURAS

±	mais ou menos
%	Porcentagem
®	Marca registrada
A	Alfa
B	Beta
Γ	Gama
μL	Microlitro
μg	Micrograma
ATP	Adenosina Trifosfato
AMPA	Ácido ácido α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxasolepropionico
ATM	Articulação temporomandibular
Ca ²⁺	Íon cálcio
Cg	Carragenina
CFA	Coadjuvante Completo de Freud
CGRP	Péptido relacionado com o gene da calcitonina
v.o	Via oral
Vs	Versus
dL	Decilitro
DTM	Disfunção temporomandibular
ANOVA	Análise de variância
E.P.M.	Erro padrão da média
<i>et al.</i>	...e colaboradores
G	Gramas
IASP	<i>International Association for the Study of Pain</i>
IL	Interleucina
INF	Interferon
i.p.	Intra-peritoneal
Kg	Kilograma
KCl	Cloreto de potássio
Mg	Magnésio
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
MG	Miligrama
PKC	Proteína quinase C
ml	Mililitro
Mm	Milímetro
mM	Milimolar
mmol/l	mili mol/ litro
NaCl	Cloreto de sódio
NMDA	NMDA
NO	Óxido nítrico
NR1	Subunidade 1 do receptor NMDA

NR2	Subunidade 2 do receptor NMDA
NR2A	Subtipo A da subunidade 2 do receptor NMDA
NR2B	Subtipo B da subunidade 2 do receptor NMDA
NR2C	Subtipo C da subunidade 2 do receptor NMDA
NR2D	Subtipo D da subunidade 2 do receptor NMDA
NR3	Subunidade 3 do receptor NMDA
NRA	Ácido ribonucleico
PH	Potencial hidrogeniônico
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i>
RNA _m	RNA mensageiro
RT-PCR	<i>Real time reverse transcription polymerase chain reaction</i>
P	Nível de significância
PBS	Tampão fosfato-salino
TNF	Fator de necrose tumoral
SP	Substância P
Sp5c	Subnucleo caudal do complexo trigeminal
Sp5i	Subnúcleo interpolar do complexo trigeminal
Sp5o	Subnúcleo oral do complexo trigeminal
WDR	<i>Wide dynamic range</i>
SNC	Sistema Nervoso Central

SUMÁRIO

IX

RESUMO	VI
ABSTRACT	VII
LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS	IX
1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Disfunção Temporomandibular.....	13
1.1.1 Modelos experimentais para o estudo das algias e alterações inflamatórias da ATM.....	14
1.1.2 Via nociceptiva trigeminal.....	16
1.1.3 Dor Orofacial e Disfunção Temporomandibular.....	19
1.1.4 Dor como um sinal da inflamação.....	21
1.1.5 Receptor NMDA e Dor.....	24
1.1.6 Magnésio.....	31
1.1.7 Justificativa.....	36
2 OBJETIVO GERAL	39
2.1 Objetivos específicos.....	39
3 MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.1 Animais.....	41
3.2 Indução de artrite na articulação temporomandibular.....	41
3.3 Avaliação de hipernocicepção mecânica.....	42
3.4 Coleta do lavado articular.....	43
3.5 Extração dos núcleos espinhais trigeminais (Sp5C).....	43
3.6 Indução da deficiência de Mg em ratos.....	44
3.7 Suplementação de magnésio.....	45
3.8 Determinação do nível de magnésio no soro.....	46
3.9 Drogas utilizadas e tratamento.....	46
3.10 Imunohistoquímica do tecido extraído do subnúcleo trigeminal da região Sp5c... ..	47
3.11 Isolamento do RNA total.....	47
3.12 Reação de transcriptase reversa.....	48
3.13 PCR em tempo real (RT-PCR).....	48
3.14 Análise estatística.....	49
4 RESULTADOS	51
4.1 Evolução temporal do efeito hipernociceptivo da artrite da ATM induzida por carragenina.....	51
4.2 Cinética da intensidade de influxo celular induzido por carragenina na cavidade articular da ATM de ratos.....	53
4.3 Efeito do antagonista do receptor NMDA na hipernocicepção orofacial induzida por carragenina.....	55
4.4 Efeito da suplementação oral do cloreto de magnésio na hipernocicepção	57

	orofacial induzida por carragenina.....	
4.5	Efeito da deficiência de magnésio na hipernocicepção induzida por carragenina..	60
4.6	Imunohistoquímica para a subunidade NR1 fosforilada de tecido do subnucleo caudal (Sp5C) de ratos.....	62
4.7	Expressão relativa de genes de RNAm das subunidades do receptor NMDA em tecido de subnucleo caudal (Sp5c) de ratos.....	64
5	DISCUSSÃO.....	69
6	CONCLUSÕES.....	90
7	REFERÊNCIAS.....	92

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Disfunção Temporomandibular

A disfunção temporomandibular (DTM) é uma condição de dor crônica que compartilha a maioria das características de outras condições de dor crônica comuns como a cefaléia e a dor lombar. Sendo bem caracterizada como uma enfermidade cujo aspecto central é de uma dor crônica flutuante podendo ser associada com as correspondentes flutuações, ou estágios de progressão, da patologia física específica, devendo-se considerar, por isso, o aspecto subjetivo da condição (DENADAI-SOUZA *et al.*, 2009, SESSLE, 2003; DUBNER, 2003).

Existem diversas condições patológicas relacionadas com dor persistente e potencialmente debilitante que afetam a região orofacial. As condições músculo esqueléticas são as mais prevalentes, e dentre essas as desordens temporomandibulares (DTM) são as mais comuns. Diversos estudos relatam prevalência variável da dor orofacial e essa variação se dá devido á diferença em conceitos, critérios de diagnósticos e tempo de avaliação (GÓES, 2001). Em um estudo envolvendo 2.504 participantes, a prevalência de dor orofacial, no período de um mês, foi de 25,8%, (MACFARLANE *et al.*, 2002). Em uma análise de 45.711 famílias, Lipton e colaboradores (1993) observaram que 22% da amostra apresentava pelo menos um tipo de dor orofacial nos últimos seis meses, sendo: 12% de origem dental, 5,3% associados à DTM e 1,4% relacionado a outros segmentos faciais. Riley & Gilbert. (2001), analisando a distribuição dos sintomas, verificaram que na região da articulação temporomandibular (ATM) a dor estava presente em 8,3% da população.

Atualmente estima-se que 80 bilhões de dólares anualmente seja o custo com a dor crônica na sociedade mundial, sendo 40% deste total relacionado com algum aspecto de dor orofacial, incluindo as desordens temporomandibulares (DONALSON and KROENING, 1979). Esses pacientes apresentam sinais e sintomas que afetam sua qualidade de vida na medida em que o sistema estomatognático é responsável pelas funções essenciais do organismo como mastigação, deglutição, fala, expressão facial e respiração, e em pacientes com DTM essas funções ficam comprometidas causando, portanto, afastamento social e problemas familiares e profissionais (MAZZETO *et al.*,

2001), sendo importante o tratamento eficaz para permitir que o paciente retorne às suas atividades normais.

O tratamento dessa condição requer conhecimento do estágio de cronicidade e do grau subjetivo de avaliação do comportamento doloroso estimado pelo paciente, sendo muitas vezes utilizados medicamentos para tratar apenas os sinais e sintomas que o paciente refere, sem, no entanto, influenciar na cura ou remissão da enfermidade em si. São utilizados os antiinflamatórios estereodais e não estereoidais, sendo esses úteis apenas nas crises. São necessárias mais pesquisas que elucidem a fisiopatologia dessa enfermidade e como se pode interferir nesse processo de forma mais eficaz. Como também são necessários mais estudos que mostrem novos alvos para fármacos ou substâncias já existentes no mercado que sejam capazes de produzir efeito curativo ou paliativo para o estado de dor crônica inerente a essa condição (OKESON, 2006; FRICTON *et al.*, 2003).

1.1.1 Modelos experimentais para o estudo das algias e alterações inflamatórias da ATM

Vários modelos experimentais têm sido desenvolvidos para o estudo das alterações inflamatórias da ATM. Alguns autores propõem a indução da osteoartrite através de procedimentos cirúrgicos (YAILLEN *et al.*, 1979; HELMY *et al.*, 1988; ISHIMARU & GOSS, 1992; LEKKAS, 1994) ou mecânicos (IMAI *et al.*, 2001), outros, entretanto, induzem alterações inflamatórias através da injeção intra-articular de substâncias algicas. Autores como Puzas *et al.* (2003) acreditam ainda não haver um modelo experimental que esclareça a fisiopatologia das DTMs em todos os estágios, da fase aguda à fase crônica. De acordo com Roveroni *et al.* (2001), essa incógnita na fisiopatologia da inflamação e da dor na ATM se deve em parte à limitação de modelos experimentais e à dificuldade em mensurar parâmetros inflamatórios na região. A saber, os diferentes modelos experimentais apresentam vantagens e desvantagens que os tornam válidos dependendo da abordagem que se pretende fazer, porém há mais similaridades que diferenças entre esses modelos e a artrite na ATM, o que justifica o seu emprego.

Um dos primeiros modelos de indução de artrite na ATM através da injeção de substâncias álgicas foi desenvolvido por Zamma *et al.* (1983), o qual utilizou estímulos mecânicos juntamente à inoculação intradérmica de adjuvante completo de Freund (CFA) na escápula parietal de ratos, sendo a artrite avaliada histologicamente. Ren & Dubner *et al.* (1999), fazendo uso dos filamentos de von Frey e pela indução da dor facial por CFA intra-articular (i.art.), desenvolveu um método mecânico que permitiu estudar a dor orofacial tanto aguda quanto cronicamente. Kerins *et al.*, em 2003, induziram inflamação/dor aguda na ATM pela injeção de CFA, avaliando tais achados através de parâmetros comportamentais alimentares. Tominaga *et al.* (1999) injetaram o antígeno de ovoalbumina para indução da artrite na ATM.

Haas *et al.*(1992) aplicaram óleo de mostarda na região temporomandibular e, através de parâmetros inflamatórios de extravasamento de azul de Evans e infiltração de neutrófilos, observaram inflamação aguda nos tecidos articulares. Fiorentino *et al.* (1999) compararam atividade inflamatória do óleo de mostarda e do glutamato aplicados na região da ATM através de parâmetros inflamatórios de extravasamento de azul de Evans e da medição do edema, e mostraram que óleo de mostarda induziu alterações inflamatórias agudas, enquanto glutamato não apresentou tal efeito.

Outros trabalhos mostraram que a aplicação i.art. de substâncias como óleo de mostarda (YU *et al.*, 1995), glutamato (CAIRNS *et al.*, 1998, 2001), substâncias álgicas (NaCl, KCl, histamina) (BROTON & SESSLE, 1988) e capsaicina (LAM *et al.*, 2005) na ATM de ratos apresentava efeitos de hiperatividade na musculatura facial.

Roveroni *et al.* (2001) administraram formalina na ATM de ratos e realizaram estudo comportamental para avaliar dor orofacial aguda. Takeuchi *et al.* (2004) induziram inflamação/dor aguda na ATM através da injeção de kaolina e carragenina, em seguida estudaram a dor baseados em parâmetros comportamentais e em preparação de nervo isolado.

Em nosso trabalho utilizamos o modelo desenvolvido por Denadai-Souza *et al.* (2009). Nesse modelo utilizamos uma substância álgica, a carragenina, para induzir uma inflamação unilateral na ATM esquerda. Essa substância foi escolhida devido ao seu efeito inflamatório prolongado e ocasionar uma indução de hipernocicepção duradoura. No trabalho de Silvia *et al.* (2009) foi analisada a região Sp5c, subnúcleo caudal do complexo trigeminal, relacionada com a hipernocicepção gerada pela carragenina em ATM de ratos, utilizando o mesmo modelo desenvolvido por Denadai-Souza *et al.*

(2009), para avaliação do papel do óxido nítrico. Dessa forma também, em nosso estudo, decidimos analisar os efeitos da hipernocicepção gerada na ATM, pelo efeito da carragenina, avaliando os receptores N-metil D-aspartato (NMDA) localizados nessa região (Sp5c), a qual é a região que recebe a maioria dos aferentes nociceptivos originados da região articular da ATM (SESSLE, 2003).

1.1.2 Via nociceptiva trigeminal

Os impulsos aferentes somáticos nociceptivos orofaciais, incluindo a articulação temporomandibular (ATM), são detectadas principalmente pelas terminações nervosas constituídas por fibras A-beta livres (fibras mielinizadas de condução rápida) e fibras C (amielinizadas e polimodais de condução lenta), as quais, respondem a estimulação nociva, além de aumentar a taxa de despolarização com o aumento da intensidade do estímulo. Elas também fornecem informações discriminativas e sensitivas desses estímulos (HARGREAVES *et al.*, 2003).

As fibras C, particularmente, parecem estar presentes na musculatura e nas articulações, sendo a principal informante nociceptiva desses tecidos. Elas apresentam pequenas respostas à contração muscular, porém uma resposta vigorosa à isquemia, íons potássio, bradicinina e prostaglandinas, além de causar uma prolongada atividade na medula espinhal, quando ativadas (causando mudanças fenotípicas, com o aumento do campo receptivo dos neurônios do corno dorsal) e provavelmente parecem atuar na nocicepção orofacial (HARGREAVES *et al.*, 2003).

Os impulsos nociceptivos que chegam ao V par de nervo craniano, a partir do nervo trigêmeo, cujos corpos celulares se localizam no gânglio trigeminal, são transmitidos diretamente ao tronco encefálico na região da ponte onde fazem sinapse com o núcleo espinhal do trigêmeo. Essa sensibilização gerada na via trigeminal, que é um processo de facilitação da passagem de estímulos nocivos ou potencialmente lesivos, no entanto, é um mecanismo de proteção do organismo contra possíveis danos teciduais. A nocicepção é uma forma especializada que o organismo possui para sinalizar informação sobre lesões teciduais em si, ou possíveis lesões teciduais. Assim, enquanto a dor envolve aspectos sensoriais e emocionais, portanto bastante subjetiva, a

nociceção refere-se às manifestações neurofisiológicas geradas pelo estímulo nocivo, ou seja, os aspectos sensoriais (SESSLE *et al.*, 2003).

O complexo trigeminal do tronco cerebral corre da ponte para a medula espinhal superior e pode ser dividida em núcleo sensitivo principal do trigêmeo e núcleo do trato espinhal do trigêmeo. Este último pode ser subdividido, rostrocaudalmente em subnúcleo oral, subnúcleo interpolar e subnúcleo caudal (OKESON, 2006) (Figura 01).

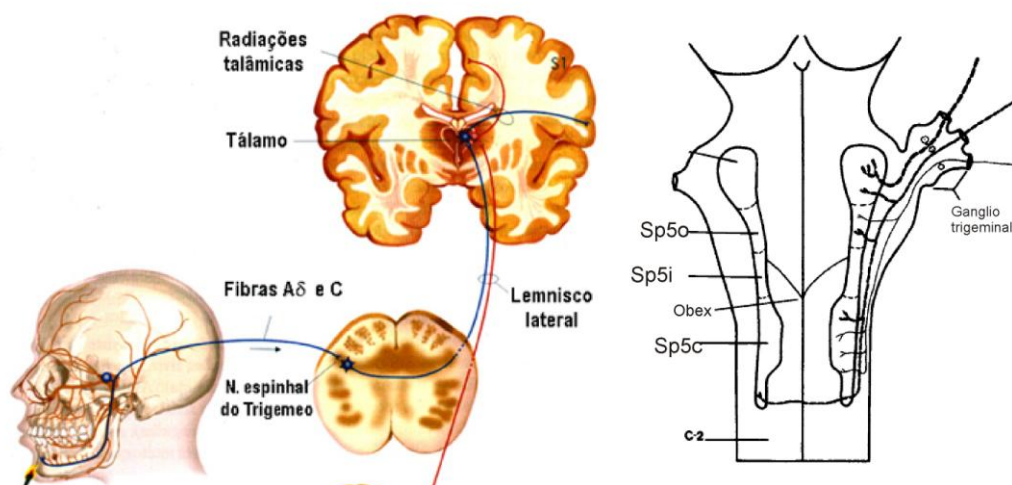


Figura 01. Representação esquemática da via nociceptiva trigeminal e da região de entrada dos aferentes primários. Sp5c, subnúcleo caudal trigeminal; Sp5o; subnúcleo oral trigeminal; Sp5i, subnúcleo interpolar trigeminal.

Os neurônios da região do subnúcleo caudal projetam-se diretamente para as regiões do tálamo posterior, cerebelo, massa cinzenta periaquedutal, formação reticular do tronco cerebral, área peribraquial pontina e medula espinhal, como também para regiões rostrais do complexo trigeminal do tronco cerebral como o subnúcleo oral. Em algumas dessas áreas, as informações sobem para processamento nos centros cerebrais mais altos e outras retransmitem as informações do subnúcleo caudal para modulação da transmissão somatossensorial (SESSLE, 2003; SESSLE, 2000; SESSLE, 2009).

A região do tronco encefálico que possui o complexo trigeminal é estruturalmente semelhante ao corno dorsal da medula espinhal. As semelhanças

morfológicas, de entrada – saídas funcionais entre o subnúcleo trigeminal caudal e o corno dorsal da medula espinhal ressaltam a importância do subnúcleo caudal nos mecanismos nociceptivos trigeminais (SESSLE, 2003).

O subnúcleo caudal tem sido tomado como local essencial do tronco cerebral para retransmissão de informações de dor orofacial para níveis mais altos do sistema nervoso central (DUBNER, 2004).

Nessa subdivisão do complexo trigeminal é onde há a conexão do aferente primário dos músculos e da ATM com o neurônio secundário, nas lâmina I/II e V/VI, além de ser, nesse local, onde se concentram neurônios de amplitude dinâmica e neurônios nociceptivos específicos (SESSLE, 2003).

Os neurônios aferentes primários do trigêmeo possuem neurotransmissores quimicamente heterogêneos, por exemplo: acetilcolina, dopamina, serotonina, histamina, transmissores peptídicos (glutamato, aspartato, peptídeos opióides), purinérgicos (adenosina trifosfato, ATP, adenosina) e outras moléculas neuroativas (substância P, neuropeptídeo Y) (LAZAROV, 2002).

Os aferentes, de tamanho pequeno localizados periféricamente, contém certos tipos de neuropeptídeos, como a substância P, e aminoácidos, como o glutamato, os quais podem estar envolvidos no processo de transmissão nociceptivo, assim também como sensibilizar os receptores NMDA periféricos ou centrais, os quais podem levar a informação nociceptiva para regiões centrais, provocando estado de hiperalgesia (WANG & GUO, 2010). Os receptores NMDA estão presentes tanto nas fibras A β como nas fibras C dos aferentes primários e são expressos perto do terminal central desses aferentes (BARDONI *et al.*, 2004).

Os sinais que são originados dos nociceptores periféricos e terminam no corno dorsal da medula espinhal (no subnúcleo caudal), também liberam outros vários mediadores químicos, como substância P e o peptídeo relacionado com o gene da calcitonina (CGRP). Esses mediadores químicos contribuem para o aumento da excitabilidade dos neurônios no corno dorsal da medula via ação de receptores ionotrópicos e receptores acoplados à proteína G, levando a um quadro de

sensibilização central. Esse aumento da excitabilidade, na medula espinhal, se dá devido a uma série de eventos incluindo a despolarização neuronal, remoção, voltagem-dependente, do bloqueio do magnésio do receptor NMDA, facilitando a entrada do cálcio na célula, a fosforilação do receptor e mudança na cinética neuronal, resultando em um aumento de conexões sinápticas (WIDENFALK & WIBERG, 1990).

Os receptores NMDA têm papel chave nesse mecanismo. A inflamação dos tecidos periféricos pode supra-regular atividade desses receptores de glutamato no corno espinhal, podendo dar início a um comportamento hiperalgésico (DUBNER, 2004; SALTER, 2004; SESSLE, 2009; BARDONI *et al.*, 2004)

1.1.3 Dor Orofacial e Disfunção Temporomandibular.

O Comitê de Taxonomia da Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP, International Association for the Study of Pain) define a dor como “uma experiência sensitiva emocional desagradável decorrente ou descrita em termos de lesões teciduais reais ou potenciais. Entretanto, as dores orofaciais, particularmente as provindas da ATM, devido a sua localização e capacidade de incapacitação, possuem uma importância especial (SESSLE, 2000).

Desordens dolorosas envolvendo a articulação temporomandibular e associada a tecidos profundos chegam a ser de 16 a 59% de sintomas relatados e 33 a 86% de sinais clínicos apresentados, sendo mais comum em mulheres do que em homens, numa proporção de 9:1. (MILAM, 2003).

Aproximadamente 25% dos indivíduos os quais têm experiência de dor temporomandibular alguma hora de sua vida procuraram por algum tratamento (FRICTON, 2003).

Desordens temporomandibulares degenerativas severas podem chegar a reduzir o suporte vertical posterior de mastigação, levando a uma grave desfiguração facial e comprometimento das vias respiratórias, da fonação e da mastigação (FRICTON, 2003).

Lesões traumáticas ou inflamatórias que afetam a articulação temporomandibular podem levar, principalmente, a anquilose articular, no pior dos casos, conseqüentemente, comprometendo a capacidade do indivíduo de se alimentar adequadamente e manter a saúde oral (MAZZETO *et al.*, 2001).

Dores provenientes da estrutura da articulação temporomandibular podem ser definidas como sendo do tipo somática profunda. A dor dessa região pode ser proveniente das estruturas de tecidos moles associadas à articulação ou dos tecidos ósseos relacionados com ela, e caso esteja relacionado com a superfície articular é comumente chamado de artrite. No entanto essas dores podem ser também músculo-esqueléticas, existindo assim uma relação direta entre dor e função mastigatória, e essa dor pode ser acentuada pela palpação ou manipulação funcional da articulação (OKESON, 2006).

A ATM é bilateral interligada pela mandíbula e interdependente, suas faces articulares são cobertas por uma fibrocartilagem hialina, possui uma sinóvia e um disco articular o qual não possui capacidade regenerativa. Existe na parte mais superior e posterior da articulação, no local chamado de côndilo da articulação temporomandibular, o coxim retrodiscal que fixa a capsula durante os movimentos. A ATM é circundada por uma capsula altamente inervada, sua inervação sensitiva é formada por proprioceptores que se relacionam com os nervos auriculotemporal, massetérico e temporal profundo posterior. A articulação temporomandibular é uma articulação sinovial programada para suportar forças extremas de mastigação (OKESON, 2006).

A dor articular artrítica, originada dessa articulação, possui várias locais origem, podendo ser ligamentar, retrodiscal, capsular ou as três juntas (OKESON, 2006).

As respostas proprioceptivas e nociceptivas dependem da presença de estruturas neurais normais, a medida que estruturas inervadas começam a se deteriorar pelo próprio processo de inflamação a resposta proprioceptiva e de dor começam a diminuir, o que refere ao clínico um dado importante (DUBNER, 2003).

Quando uma condição potencialmente lesiva induz uma dor artrítica da ATM, se tornando inflamatória, esse processo pode resultar em uma contínua condução de impulsos aferentes, adquirindo, assim, a propensão a induzir efeitos excitatórios centrais secundários, complicando ainda mais o quadro clínico, pois esses efeitos secundários podem provocar dores referidas como cefaléias, hiperalgesia secundária caracterizada por regiões superficiais (referentes aos dermatômos) dolorosas, áreas com alta sensibilidade, ativação do sistema autônomo, criando vasodilatação, coriza, vermelhidão facial, com áreas sensíveis à palpação e sintomas musculares secundários como a co-contracção involuntária (DUBNER, 2003). Esse último efeito pode tornar-se um ciclo vicioso de dor e estimulação muscular algica, chamada de dor muscular cíclica, podendo ser completamente independente da causa iniciadora (FRICTON, 2003).

1.1.4 Dor como um sinal da inflamação

A dor inflamatória é uma consequência de uma lesão tecidual a qual sensibiliza os neurônios nociceptivos periféricos por meio de mediadores químicos e celulares pró-inflamatórios (HELLER *et al.*, 1992).

O estado de hiperalgesia ou hipernocicepção inflamatória é resultado de modificações metabotrópicas funcionais nos neurônios aferentes primários nociceptivos, o que facilita a ativação dessas vias. A mudança do limiar de excitabilidade funcional neural pode ser resultado da indução de mediadores inflamatórios liberados nas células dos tecidos lesados ou por algum elemento estranho mediado celularmente (FRICTON, 2004; HELLER *et al.*, 1992).

As fibras sensoriais tipo A-delta e C estão associadas à inflamação e vão do nível periférico para o sistema nervoso central passando pelo gânglio da raiz dorsal, onde se localizam seus corpos celulares, terminando em diferentes locais da medula, como nas lâminas, principalmente I e II (conhecida como substância gelatinosa). Desse ponto as informações nociceptivas são transmitidas pelos neurônios secundários para os centros superiores. As informações que chegam as camadas mais profundas das lâminas, são formadas por fibras neuronais de grosso calibre, mielinizadas e de transmissão rápida do tipo de ampla faixa dinâmica (WDR - wide dynamic range

neurons). Há também a presença de interneurônios na medula espinhal que modulam as informações provenientes da periferia (HARGREAVES *et al.*, 2003).

A propagação do impulso sináptico é feita entre o neurônio aferente primários e os secundários por meio de neurotransmissores como, principalmente, aminoácidos excitatórios como o glutamato ou a substância P e CGRP que vão sensibilizar os interneurônios na medula espinhal que modulam as informações provenientes da periferia (HARGREAVES *et al.*, 2003; DUBNER, 1983; BATTAGLIA and RUSTIONI., *et al* 1988; SMITH *et al.*, 1993).

Ao receber o impulso, o neurônio terciário chega ao córtex para ser processado, onde será analisado e interpretado de acordo com a experiência da sensação de dor prévia, determinando (através da consciência) a localização, a intensidade e a resposta somática ao estímulo (MILLAN, 1999; SESSLE, 2000).

É interessante salientar que, segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor, há uma definição diferente para alodinia e hiperalgesia, sendo a alodinia uma resposta dolorosa a um estímulo primário, o qual não havia provocado nenhuma sensação de dor antes, e hiperalgesia é uma resposta nociceptiva aumentada a um estímulo o qual tenha sido previamente causada alguma sensação dolorosa. Isso muda a percepção do organismo em intensidade e qualidade da dor. Dessa forma o termo hipernocicepção neuropática é o que mais se adequa à sensação dolorosa experimentada em modelos animais de neuropatia ou de sensibilização neuronal por inflamação, nesse caso podendo ser denominada de hipernocicepção inflamatória (FERREIRA *et al.*, 2009).

A membrana celular dos neurônios WDR possui muitos receptores que respondem a vários agentes neuromecânicos. O primeiro evento nociceptivo, carregado pelas fibras A-delta para o SNC, causa a liberação de neuroquininas como substância P que atuam sobre a AMPA (α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico) e sobre receptores metabotrópicos no WDR, ou sobre os interneurônios segmentais (DOUGHERTY *et al.*, 1993).

Este evento causa a despolarização de neurônio WDR, enviando uma mensagem ascendente para o tálamo e sobre o córtex somatossensorial, onde é percebida como dor aguda. Se a torrente de atividade aferente é intensa o suficiente, fibras C liberam o aminoácido excitatório, o glutamato, o qual possui atividade agonista sobre o receptor NMDA (DOUGHERTY *et al.*, 1993).

Glutamato é o principal mediador da dor crônica (WILCOX *et al.*, 1993). O receptor o qual ele ativa (NMDA) é um canal iônico que, quando em repouso, está normalmente bloqueado pelo Mg^{2+} . Mediante a uma despolarização inicial do neurônio O Mg^{2+} é expelido do canal e este é aberto permitindo o influxo principalmente de cálcio no neurônio WDR.

Óxido nítrico é produzido no WDR através da influência do complexo cálcio/calmodulina sobre a óxido nítrico sintetase. Pensa-se que o óxido nítrico seja um dos agentes que causam o processo de sensibilização central, devido ao fato de que o pré-tratamento com um antagonista NMDA ou um substrato não ativo de óxido nítrico previne esse processo (DICKSON, 1990; MALMBERG & YAKSH, 1993; WILLIS, 1993). Óxido nítrico é um neurotransmissor gasoso que facilmente se dispersa para fora da célula para causar ação em outras áreas. Acha-se que existe atividade pré-sináptica no botão terminal das fibras C, causando mais liberação de aminoácidos excitatórios como glutamato, assim como de substância P e outras neuroquininas (DOUGHERTY & LENZ, 1994; MALMBERG & YAKSH, 1993). Isto resultaria em mais excitação no WDR e traria à tona um ciclo de dor (TOREBJÖRK *et al.*, 1992). O sistema é autoalimentado, e a dor se torna contínua, até que o processo seja interrompido pela parada do mecanismo excitatório central ou por medicamentos de ação periférica.

Pensa-se que esse processo de despolarização contínua e a liberação de neurotransmissores excitatórios além de substâncias pró-inflamatórias centralmente seja um mecanismo para originar um quadro de dor contínua em condições como artrite da ATM, neuralgia trigeminal e cefaléias relacionada a estruturas crânio-faciais (SESSLE, 2003).

1.1.5 Receptor NMDA e Dor

O mecanismo pelo qual os tecidos lesados produzem um estado de dor representa uma das áreas mais estudadas em ciências biomédicas por várias décadas.

A maior parte dos avanços nesse campo foi produzida no final da década de 80, quando alguns grupos demonstraram que a administração de antagonistas dos receptores NMDA espinais inibía a hiperexcitabilidade dos neurônios da medula espinhal induzida pela estimulação das fibras-C. Desde então muitos estudos têm sido publicados enfatizando que a ativação de receptores NMDA, após a injúria tecidual seguida de inflamação, facilita o processamento na medula espinhal.

Não diferente do restante do corpo, a face e o sistema mastigatório, cuja sensibilidade nociceptiva é feita principalmente pelo ramo sensitivo do nervo trigêmeo, também parece ter a participação dos receptores NMDA nos fenômenos nociceptivos. Apesar de ser um assunto pouco estudado, alguns autores vêm demonstrando o papel desses receptores na sensibilização da articulação temporomandibular após a injeção de estímulos inflamatórios e nociceptivos como capsaicina e óleo de mostarda. Utilizando bloqueadores e antagonistas dos receptores NMDA, foi demonstrado que esses receptores são necessários para que ocorra tanto sensibilização periférica como sensibilização central (LAM *et al.*, 2005; CAIRNS *et al.*, 2003; YU *et al.*, 1996). Esses autores utilizaram técnicas de eletromiografia nos músculos masseter e digástrico e também mediram a expressão de c-fos no gânglio trigeminal e nos núcleos espinais trigeminais. Mais recentemente Lam *et al.* (2009) demonstraram que receptores periféricos metabotrópicos do glutamato também são importantes para a sensibilização periférica no músculo masseter associando a participação da PKC (Proteína Quinase C) nesse processo, tendo todas essas estruturas musculares a sensibilidade mediada pelo via trigeminal.

Os aminoácidos excitatórios exercem seus efeitos, tanto no cérebro como na medula espinhal. Eles podem ser encontrados tanto nos neurônios da raiz sensitiva como no gânglio trigeminal e numa infinidade de terminais cutâneos nervosos de fibras aferentes. Seus efeitos pós-sinápticos são realizados via diversas subclasses de

receptores de membrana como os metabotrópicos e os ionotrópicos. Os subtipos de receptores ionotrópicos de aminoácidos excitatórios, os quais ativam proteína G, são denominados segundo o agonista que os ativa, incluindo aqui o NMDA, AMPA e kainato (DUBNER, 2004).

Desses receptores o NMDA têm recebido uma particular atenção por causa do papel crucial na transmissão sináptica excitatória, plasticidade e neurodegeneração no sistema nervoso central. Os receptores NMDA exibem várias propriedades singulares que os distinguem de outros canais iônicos. Primeiro, esse receptor controla um canal de cátion que é altamente permeável a íons de cálcio e outros íons monovalentes. Segundo, a ligação simultânea de glutamato e glicina é requerida para a ativação desse receptor. Terceiro, no potencial de repouso da membrana, os canais de receptores NMDA estão bloqueados pelo magnésio extracelular e apenas se abre em despolarização por simultânea ligação de seus agonistas (SESSLE, 2009).

O receptor NMDA ainda apresenta vários outros sítios de ligação, que podem modular a atividade do canal: sítio da fenciclidina, localizado dentro do canal, o sítio para ligação da glicina, sítios para ligação de poliaminas (SUCHER *et al.*, 1996), um sítio de ligação do zinco, além de um sítio sensível à oxidação ou redução (LEHMANN *et al.*, 1990). O íon magnésio se encontra localizado no neurônio glutamatérgico e age em um determinado sítio dentro do receptor exercendo principalmente efeitos inibitórios sobre esse receptor (Figura 02) (SESSLE, 2009).

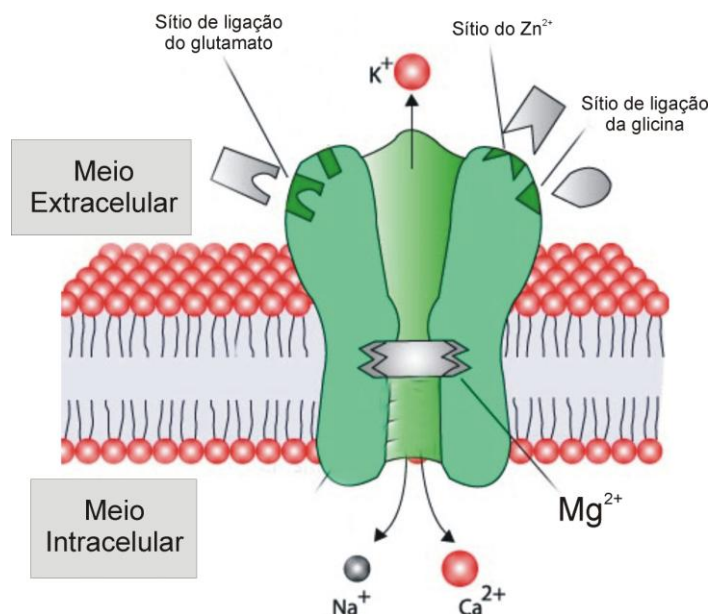


Figura 02. Desenho esquemático do receptor NMDA. Está evidenciado sítio de ligação do magnésio (Mg^{2+}) no interior do canal, formando um tampão fisiológico durante um potencial de repouso da membrana, zinco (Zn^{2+}), sítio de ligação do glutamato e da glicina. Fonte: modificado de <http://www.uochb.cz>. Acesso em 01/01/2012

O receptor NMDA desempenha um papel importante na mediação pelo glutamato em processos como plasticidade neuronal e neurotoxicidade no sistema nervoso central. Esse receptor é composto de várias subunidades fundamentais no processo de polarização e sensibilização da célula neuronal (SAKURADA *et al*, 1993). Os receptores NMDA são compostos de subunidades NR1, NR2 (A,B,C e D) e NR3 (A e B). Estudos de co-expressão têm demonstrado que a formação de canais receptores NMDA requer a combinação de NR1, uma subunidade essencial para a formação do canal, e pelo menos uma das subunidades NR2 ou NR3 (Figura 03) (MORI & MISHINA *et al.*, 1995).

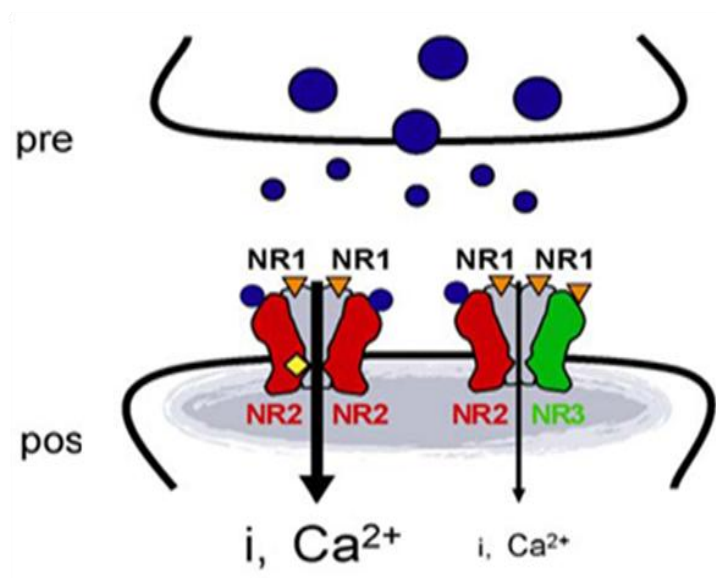


Figura 03: Modelo demonstrando a conformação dos subtipos de receptores NMDA. Receptores NMDA contendo as subunidades NR2 ligadas com glutamato (vermelho) são altamente permeáveis ao cálcio e dependentes de despolarização pós-sináptica devido ao bloqueio do magnésio. Por outro lado, receptores NMDA contendo subunidades NR3 ligadas a glicina (verde) com menor fluxo e menor corrente ("i"), sendo menos permeáveis ao cálcio e menos sensíveis ao bloqueio de magnésio (adaptado de HENSON *et al.*, 2010).

Os receptores NMDA são geralmente compostos por subunidades NR1/NR2 mas pode conter subunidades moduladoras NR3. A inclusão de subunidades NR3, em sistemas heterólogos de combinação das subunidades, reduz a amplitude e diminui consideravelmente a permeabilidade do cálcio nos receptores NMDA em camundongos transgênicos. Haja vista que o influxo excessivo de cálcio em neurônios é um passo crucial para a excitotoxicidade, mostrando, assim, que as subunidades NR3A são neuroprotetoras (NAKANISHI *et al.*, 2009) (figura 03).

Em relação às subunidades do receptor NMDA, o subtipo NR1 tem sua proteína expressa amplamente na medula. Em relação à subunidade NR2, seu RNA mensageiro e sua proteína são mais abundantes e encontrados em todas as lâminas do substância gelatinosa da medula. A proteína NR2B é encontrada nas lâminas I e II (ZHANG *et al.*, 2009; MA *et al.*, 2000) exatamente onde se encontram as sinapses entre os aferentes que chegam à ponte e o neurônio de segunda ordem que sai do subnúcleo caudal trigeminal (LOFTIS *et al.*, 2003). O RNA mensageiro e a proteína NR2C raramente são detectados (MARVIZON *et al.*, 2002), enquanto o RNA mensageiro da subunidade

NR2D e suas proteínas são expressas em níveis baixos em ambos o corno ventral e dorsal da medula espinhal (MARVIZON *et al.*, 2002).

Recentemente, tem sido mostrado que fibras nociceptivas periféricas dos receptores NMDA expressam as subunidades NR2B e NR2D, mas a subunidade NR2A parece estar ausente nos terminais periféricos dos aferentes primários (MA *et al.*, 2000).

Alguns trabalhos mostram que no gânglio da raiz dorsal (ou gânglio espinhal) que contém corpos celulares de neurônios aferentes dos nervos espinhais estão presentes as subunidades NR1, NR2B, NR2C, NR2D, mas não o NR2A (MARVIZON *et al.*, 2002).

Dados recentes mostram que os padrões de expressão das subunidades do receptor NMDA podem ser alterados como consequência de uma lesão tecidual ou nervosa periférica. Além disso estudos mostram que um processo inflamatório periférico pode alterar as propriedades no receptores NMDA na espinha dorsal (GUO & HUNG, 2001).

Achados recentes enfatizam que a excitabilidade aumentada no corno dorsal da coluna vertebral após a inflamação leva ao aumento da expressão do gene do receptor NMDA na medula espinhal (MIKI *et al.*, 2002). Além disso, como indicado por análise de RT-PCR, há um aumento da regulação da expressão do gene do RNA mensageiro para as subunidades NR1, NR2A e NR2B no corno dorsal da medula espinhal após em modelo de inflamação em ratos (PETRENKO *et al.*, 2003).

É interessante estabelecer o significado da expressão das diferentes subunidades nas respostas do receptor NMDA em condições patológicas. Inflamação e lesões nervosas são muitas vezes acompanhada de inchaço e alterações morfológicas em células neuronais e não neuronais. Estas mudanças também têm sido associadas com alterações estruturais do receptor NMDA e na expressão diferenciada das suas subunidades (TANIGUCHI *et al.*, 1997). Estudos mostram que a inflamação por induzir um rompimento de interações entre receptores NMDA e a ancoragem ou moléculas do citoesqueleto poderia exacerbar a atividade moduladora da PKC e alterar as

propriedades dos receptores NMDA. As respostas mediadas pelo receptor NMDA são caracterizadas como lentas e de longa duração (FORMAN *et al.*, 2009), uma das consequências das respostas mediada pelo receptor NMDA nos neurônios de animais tratados com CFA é a de apresentarem maiores e mais longos potenciais excitatórios pós-sinápticos (EPSPs) no corno dorsal. Essas respostas sinápticas amplificadas podem facilitar a deflagração de respostas sinápticas de neurônios, um fenômeno freqüentemente observado em condições inflamatórias e de lesão nervosa (LEEM *et al.*, 1996).

Além disso o aumento da atividade sináptica envolvendo a atividade aumentada do receptor NMDA, aumenta a entrada de cálcio devido ao aumento na permeabilidade para esse íon no receptor. O aumento no influxo do cálcio pode, ainda mais, aumentar o efeito do PKC na resposta do receptor NMDA, diminuindo a afinidade do receptor NMDA pelo magnésio, facilitando a transmissão de estímulos nociceptivos (DUBNER, 2004).

A fosforilação de proteínas é o principal mecanismo para regulação da função dos receptores NMDA. De fato a fosforilação pode ser o mecanismo pelo qual a PKC regula a função dos receptores NMDA (LIAO *et al.*, 2001) através do processo de ativação da cascata da tirosina-quinase (LU *et al.*, 1999). Evidências vêm aumentando sobre o fato da ação moduladora da PKC nos receptores NMDA, ainda mais, a participação da PKC pode estar relacionada com a densidade pós-sináptica e proteínas do citoesqueleto em modelo de inflamação (SHENG & PAK, 2000).

Há evidências que sugerem também que o papel para os receptores NMDA na mediação da sensibilização supra-espinhal, mostrando um aumento da ativação desses receptores como resultado da hiperexcitabilidade neuronal nos circuitos do tronco cerebral induzida por uma inflamação (TERAYAMA *et al.*, 2000).

O glutamato é um neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central, sendo um agonista de receptores de aminoácidos excitatórios. Ele tem um papel essencial na sensibilidade espinal, contribuindo para um estado de dor patológica, como já mencionado. Essa sensibilização aumentada a nível central se dá, por exemplo, com o aumento no número de receptores ionotrópicos e metabotrópicos que são alvos do

glutamato. No entanto sabe-se que esse aminoácido também possui efeito nociceptivo nos tecidos periféricos sensibilizando principalmente os receptores NMDA (SESSLE, 2003; LAM *et al.*, 2005).

Contudo umas das características peculiares da espinha dorsal é a presença de receptores NMDA pré-sinápticos, e de fato, as fibras aferentes de pequeno diâmetro que terminam na espinha dorsal expressam os receptores NMDA, e a ativação pré-sináptica desse receptor causa a liberação da substância P e CGRP dos aferentes primários. Além disso, o glutamato liberado do terminal pré-sináptico pode, potencialmente, melhorar a sua própria liberação na forma de retroalimentação em resposta a estímulos subsequentes. Sendo o subnúcleo caudado do trigêmeo homólogo a substância gelatinosa da medula espinhal, esse processo em resposta a estímulos nociceptivos ocorre da mesma forma no subnúcleo caudal, assim como ocorre no corno dorsal da medula (OKESON, 2006; SESSLE, 2003; DUBNER, 2004).

Vale ressaltar que, embora a função do NMDA seja essencial para o processo de manutenção da dor persistente, uma droga que potencialize as respostas do receptor NMDA não é necessariamente uma promotora de um estado de hiperexcitabilidade e dor, mas pode ser também inibitória do processo de hiperexcitabilidade, haja vista que receptores NMDA estão localizados em ambos os neurônios excitatórios e inibitórios (PETRENKO *et al.*, 2003).

De fato, em ratos com inflamação, a gabapentina, um anticonvulsivante amplamente prescrito para o tratamento da dor crônica, pode exercer seu efeito antinociceptivos aumentando a atividade dos neurônios inibitórios no corno dorsal por ativação dos receptores NMDA, e curiosamente, a ativação extrasináptica desses receptores no corno dorsal da medula espinhal (presumivelmente contendo subunidades NR2B) podem contribuir para a ação antinociceptiva da gabapentina (OLIVAR & LAIRD, 1999).

Apesar de os receptores NMDA, especialmente os localizados na medula espinhal, continuarem recebendo grande atenção, evidências se acumulam sugerindo que esses receptores localizados em tecidos periféricos somáticos e o mecanismo da dor visceral possuem também um importante papel na nocicepção. Assim como em estado

de dor crônica, existe a ativação desses receptores ocorrendo em vários níveis do sistema nervoso, e por isso, cada nível deve ser considerado como um alvo em potencial para uma intervenção terapêutica (LAM *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2010).

Consistente com isso, os antagonistas dos receptores NMDA tem mostrado aliviar efetivamente o comportamento doloroso em modelos animais assim como também em algumas situações clínicas (FISHER *et al.*, 2009; HEWITT *et al.*, 2000).

Podemos perceber que os receptores NMDA são importantes para o funcionamento normal do sistema nervoso, e o uso de antagonistas desses receptores pode ter uma ação fundamental para analgesia de processos nociceptivos, no entanto o uso de antagonistas seletivos desse receptor pode ser limitado devido aos seus diversos efeitos colaterais causado pela sua inibição (KOVACIC & SOMANATHAN, 2010). Mas alguns trabalhos mostram que antagonistas seletivos para as subunidades específicas como NR2-B mostram boa eficácia em modelos de dor em animal, sem apresentar efeito colaterais indesejáveis, como também a utilização de magnésio pode ter uma boa eficiência na inibição da hipernociceppção, sendo utilizado sozinho ou como adjuvante (CHIZH *et al.*, 2001; BEGON *et al.*, 2000; TONG *et al.*, 2008).

1.1.6 Magnésio

Magnésio é o 4º mineral mais abundante no corpo e é essencial a saúde. Aproximadamente 50% do magnésio total é encontrado no osso. O restante encontra-se dentro das células de tecidos e órgãos, e apenas 1% encontra-se circulante no sangue, mas o organismo trabalha duramente para manter as concentrações sanguíneas estáveis (SAKURADA *et al.*, 1993). É um mineral necessário para mais de 300 reações bioquímicas importante no remodelamento ósseo, regulação da pressão arterial e da glicemia, metabolismo energético e síntese de proteínas além de promover manutenção das funções normais dos músculos e nervos. O processo de absorção do magnésio da dieta é feito diretamente pelos intestinos e excretado pelos rins, logo qualquer doença metabólica que comprometa essas duas estruturas pode comprometer a absorção de magnésio, causando a deficiência desse íon no organismo (SARIS *et al.*, 2000)

As fontes alimentares ricas em magnésio incluem os vegetais verdes como o espinafre (pois o centro da molécula de clorofila contém magnésio), nozes, castanhas e sementes e de uma forma geral todos os grãos não refinados constituem boas fontes de magnésio. O processamento dos alimentos, refinamento da farinha de trigo, sal e do açúcar retiram o conteúdo rico em magnésio desses alimentos e fazem com que a maioria dos alimentos industrializados contenha baixas quantidades desse mineral (*Institute of Medicine, 1999; U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. 2003*).

As causas da deficiência de magnésio podem ser classificadas em primária e secundária, onde o consumo insuficiente, a ingestão de açúcar e gordura em excesso, a desnutrição protéico-calórica e a nutrição parenteral deficiente em magnésio, fazem parte da deficiência primária. Em contrapartida o alcoolismo, a absorção diminuída, diarreia ou abuso de laxantes, síndrome de má-absorção, vômitos, excreção renal aumentada, doença tubular, glomerulonefrite, desordens metabólicas e endócrinas (ex. hipertireoidismo, hipercalcemia, diabetes mellitus), medicamentos, gravidez, stress físico e mental, compreendem as causas da deficiência secundária de magnésio (*SARIS et al., 2000*).

A maior parte dos brasileiros não consome a quantidade recomendada de magnésio, que é de 300 mg por dia (Ingestão Diária Recomendada, Portaria n.º 31, 1998), uma vez que não tem por hábito ingerir sistematicamente sua principal fonte – os vegetais verdes. Uma pesquisa realizada pela *USDA Food Consumption Survey*, revelou que 74% dos entrevistados não atingiam as recomendações propostas pelo *National Research Council (NRC – RDA, 1989)*. Além do consumo insuficiente, o stress tem sido apontado como um dos principais fatores que depletam magnésio, onde a reposição do mineral surte efeitos favoráveis.

1.1.6.1. Importância do Magnésio na fisiopatologia da dor

Existe relação entre patologias dolorosas crônicas e deficiência de magnésio. A exemplo disso, *Altura & Altura. (2001)* revisando o assunto, sugeriram que deficiências dietéticas de magnésio bem como erros de metabolismo de magnésio são provavelmente fatores importantes na etiologia da vários tipos de cefaléia e que esse mineral poderia

ser utilizado como uma ferramenta profilática e terapêutica no tratamento das crises de enxaquecas e na diminuição da sua frequência. Durante mais de 18 anos inúmeros investigadores, neurologistas e fisiatras têm demonstrado a importância desse fato principalmente nas enxaquecas do tipo tensional. Outros têm demonstrado e sugerido que a deficiência de magnésio facilita o desenvolvimento de neuropatias (BRILL *et al.*, 2002).

Foi demonstrado por Begon *et al.* (2001) que a depleção de magnésio por 9 dias em ratos através da privação na dieta fez com que esses animais desenvolvessem espontaneamente um quadro de hiperalgesia mecânica avaliada pelo modelo de Randal Selitto. O quadro de hiperalgesia era revertido pela administração de sulfato de magnésio ou de antagonistas dos receptores NMDA, sugerindo que o quadro de deficiência de magnésio promoveria uma ativação anormal desse tipo de receptores (BERGON *et al.*, 2001). Isso está em consonância com a literatura que explica que os receptores AMPA e NMDA, pertencentes à família de receptores dos aminoácidos excitatórios, estão envolvidos nos fenômenos nociceptivos cada um com a sua importância. Quando uma estimulação dolorosa curta é aplicada, os receptores AMPA sozinhos parecem mediar a transmissão excitatória e serem responsáveis pelo nível basal de nocicepção, enquanto os receptores NMDA não são ativados, pois o seu canal encontra-se ocupado por um nível fisiológico de magnésio agindo como um tampão. Entretanto, em quadros de dor crônica, ambos os receptores são envolvidos. Uma estimulação intensa dos aferentes primários, com o aumento da frequência de estimulação, excede o limiar e o bloqueio voltagem-dependente exercido pelo magnésio nos canais NMDA, o qual é removido permitindo a ativação desses receptores (MAYER & WESTBROOK, 1987). Como consequência, a abertura do canal NMDA permite o influxo de cálcio para o interior da célula neuronal causando uma cascata de eventos intracelulares que incluem a ativação de PKC, produção de NO e transcrição gênica imediata (c-fos:c-jun). Os receptores NMDA também parecem ser modulados por peptídeos como a substância P, a qual é liberada juntamente com o glutamato pelas fibras aferentes primárias, para estender e manter o processo nociceptivo. Todos esses eventos são responsáveis pelas mudanças a longo prazo associadas à dor crônica (CODERRE *et al.*, 1993).

Petrenko *et al.* (2003) demonstraram que a administração de adjuvante completo de Freund (CFA) parece reduzir o bloqueio do magnésio e inverter a polarização celular neuronal, provocando uma hiperpolarização, pela abertura contínua nos dos receptores NMDA. Essas mudanças, as quais parecem ter forte influência da proteína quinase C (PKC), podem levar a um aumento na transmissão sináptica na medula e contribuir para o desenvolvimento de respostas patológicas associadas à lesão tecidual.

O magnésio age como um modulador do receptor NMDA e atua como um antagonista natural do cálcio, (EVANS *et al.*, 1978) sendo capaz de: suprimir respostas de dor em modelos de dor neuropática em animais (XIAO & BENNET, 1994) , conseguir melhorar cefaléia do tipo migrânea em humanos (MAUSKOP *et al.*, 1995) e melhorar a dor pós cirúrgica, também em humanos (TRAMER *et al.*, 1996). Felsby *et al.* (1995) conseguiram obter melhoras em pacientes com dor neuropática crônica de etiologia variada após a administração de bolus de cloreto de magnésio (0.16 mmol/kg) seguido de infusão do cloreto de magnésio (0.16 mmol/ kg/hora) sem que eles tenham apresentado efeitos adversos importantes (FELSBY *et al.*, 1995).

Existe na literatura estudo que indica o papel do magnésio agindo como adjuvante em pacientes com câncer, através de administração intravenosa de sulfato de magnésio nas doses de 0,5 a 1 g/kg por paciente, mostrando inclusive que essas doses parecem ser seguras e bem toleradas. Sendo, ele, portanto, uma potente arma analgésica para paciente que apresentam dores crônicas (VINCENT *et al.*, 2000).

Estudos mostram que o magnésio atua bloqueando os receptores NMDA, e esse bloqueio é essencialmente alterado pela presença do PKC intracelular, pois quando essa substância está presente, após a indução de um processo inflamatório induzido por CFA, por exemplo, há uma inversão na polaridade celular neuronal, levando à uma redução na afinidade do receptor NMDA pelo magnésio, facilitando a passagem de corrente de cálcio' causando aumento na despolarização ou um estado de hiperpolarização (GUO *et al.*, 2007).

Os níveis endógenos elevados de PKC, observados após inflamação, parece alterar o bloqueio do magnésio, isso é uma das características dos canais do receptor

NMDA, e, portanto, são capazes de modular a atividade dos canais desse receptor (HUA GUO & HUANG, 2001).

Mudanças de desenvolvimento da expressão nas subunidades do receptor NMDA podem também contribuir para a variância no bloqueio do magnésio e na modulação PKC. Subtipos de receptores NMDA, expresso em neurônio da coluna dorsal não foram completamente determinados ainda (NABEKURA *et al.*, 1994).

1.1.6.2. Importância do Magnésio na inflamação

Em uma revisão recente Mazur *et al.* (2007) resumiram os achados experimentais que demonstram que o magnésio modula os eventos envolvidos na inflamação. Deficiência de magnésio induzida experimentalmente em ratos induz, após poucos dias, síndrome inflamatória clínica caracterizada por ativação de macrófagos e leucócitos, liberação de citocinas e proteínas de fase aguda e excessiva produção de radicais livres. Aumentos na concentração extracelular de magnésio inibem a inflamação enquanto que diminuição na concentração de magnésio resulta em ativação celular. Como o magnésio atua como um antagonista natural do cálcio, a base molecular para a resposta inflamatória provavelmente é resultado da modulação da concentração de cálcio intracelular. O “priming” de células fagocíticas, a abertura de canais de cálcio e ativação dos receptores NMDA, ativação do fator de transcrição NF κ B vêm sendo considerados mecanismos potenciais. Ademais, a deficiência sistêmica de magnésio induz uma resposta sistêmica de estresse por ativação de vias neuro-endócrinas. Como os sistemas imune e nervoso interagem bidirecionalmente, o papel de neuromoduladores também vem sendo considerado. A deficiência de magnésio contribui para uma resposta imune exagerada ao estresse e ao estresse oxidativo em consequência à resposta inflamatória (BEGON *et al.*, 2000).

A inflamação contribui para alterações pró-aterogênicas no metabolismo das lipoproteínas, disfunção endotelial, trombose, hipertensão e explica o efeito do agravamento do efeito da deficiência de magnésio na síndrome metabólica. Estudos futuros são necessários para entender o papel do magnésio na resposta imune em humanos. Mas esses achados experimentais em modelos animais sugerem que a

inflamação parece ser o elo para explicar o papel do magnésio em várias condições patológicas (MAZUR *et al.*, 2007).

Mazur *et al.* (2007) também comentam que a deficiência de magnésio está relacionada com a morte celular correlacionada ao processo oxidativo, relatando que altos índices de estresse oxidativo em deficiência de magnésio está correlacionado com fatos como: aumento na peroxidação de lipoproteína, redução na capacidade antioxidante e aumento nos níveis de óxido nítrico no plasma, além de modificação oxidativa de proteínas.

Nos estudos relatados por Mazur *et al.* (2007) são utilizados vários sais de magnésio em doses não padronizadas para o tratamento de vários tipos de quadros dolorosos, no entanto, serão necessários mais estudos para estabelecer o protocolo de utilização desses sais de magnésio, pois não existe, na literatura, protocolo estabelecido, comprovando a eficácia de um composto como padrão.

1.1.7 Justificativa

A dor das disfunções temporomandibulares é a segunda maior causa de dor orofacial de origem não dental. A sua etiologia é multifatorial e o tratamento eficaz ainda é um desafio na clínica odontológica. A sensibilidade da região orofacial é mediada pela via trigeminal. Essa via possui características anatômicas e fisiológicas que a diferenciam das vias sensitivas do restante do corpo.

Ultimamente, os receptores NMDA vêm recebendo bastante atenção devido ao seu papel fundamental no processo nociceptivo, sendo apontado como fator chave na evolução da dor aguda para a dor crônica. Atualmente sua importância ainda é pouco evidenciada na via trigeminal nociceptiva, mas as poucas evidências já mostram a influência desse receptor na via. O receptor NMDA tem uma estrutura complexa e é formado por diversos tipos de subunidades que variam de acordo com sua localização no sistema nervoso assim como é modulado por neurotransmissores e íons. Dentre esses, o magnésio chama atenção por ser um modulador do canal desse receptor. Seu efeito analgésico e neuromodulador já foi investigado em alguns modelos experimentais e em humanos, mas o seu efeito sobre a dor orofacial ainda não foi demonstrado, assim

como o exato mecanismo antinociceptivo. Em adição, a literatura evidencia que existe uma deficiência nutricional de magnésio devido a fatores alimentares, doenças metabólicas e principalmente ao estresse físico e psicológico. Sabendo-se disso resolvemos estudar o grau de influência do receptor NMDA na via nociceptiva trigeminal, assim como também investigar o efeito do magnésio sobre a nocicepção orofacial e sobre esse receptor. Esse estudo pode contribuir para o entendimento dos processos nociceptivos orofaciais buscando uma alternativa complementar ao tratamento convencional das desordens dolorosas associadas à articulação temporomandibular.

OBJETIVOS

2 Objetivo Geral

Investigar a participação dos receptores NMDA na via nociceptiva trigeminal e o efeito modulador do magnésio no modelo de artrite da articulação temporomandibular induzida por carragenina em ratos.

2.1 Objetivos específicos

- Estudar a participação dos receptores NMDA na hipernocicepção mecânica inflamatória da artrite temporomandibular induzida por carragenina
- Estudar o efeito da suplementação com cloreto de magnésio e da deficiência de magnésio na hipernocicepção mecânica inflamatória da artrite temporomandibular induzida por carragenina
- Estudar o efeito do cloreto de magnésio e da deficiência de magnésio sobre a fosforilação dos receptores NMDA no subnúcleo caudal trigeminal
- Estudar o efeito do cloreto de magnésio e da deficiência de magnésio sobre a expressão do RNAm das subunidades NR1, NR2B e NR3A na região do subnúcleo caudal trigeminal.

MATERIAIS E MÉTODOS

3 Materiais e métodos

3.1 Animais

Nos experimentos foram utilizados ratos Wistar machos (pesando 180-200g), mantidos em uma sala com temperatura controlada (22° C). O protocolo experimental foi previamente aprovado pela Comissão de Ética Animal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (protocolo de número: 3010). Foi aprovado e seguindo o guia de ética da Associação Internacional para o Estudo da Dor. Para cada experimento, foi feito um estudo cego.

Foram feitos esforços para reduzir o número de animais necessários e o estresse a que seriam submetidos.

3.2 Indução de artrite na articulação temporomandibular

A inflamação da articulação foi induzida por injeção de uma solução de Carragenina (Cg; 5% ou 500 mg / articulação, diluída em solução salina estéril) no volume de 10 µl, por via intrarticular (i.art.) no espaço supra-discal do lado da ATM esquerda, utilizando uma micro seringa (Hamilton modelo 702RN; Hamilton Co., Reno, NV, EUA). acoplado a uma agulha gengival 30 G adaptada (BD, Franklin Lakes, NJ, EUA). Como procedimento controle, em outro grupo de animais, foi injetado intrarticularmente, na ATM esquerda, uma solução de salina estéril no mesmo volume, sendo sempre utilizado anestésico para realização dos procedimento de injeção com tribromoetanol 2,5% (250 mg / kg de peso corporal, ip) (Figura 04).

Antes das injeções de carragenina ou salina, a pele da região da ATM foi cuidadosamente tricotomizada, na região póstero-inferior do arco zigomático, a qual era palpada e a agulha era inserida no local inferior a este ponto e avançada na direção medial e anterior até que a agulha entrasse em contato com o côndilo. Este contato era verificada pelo movimento da mandíbula, e a punção da agulha no espaço articular era confirmado pela perda de resistência. Aspiração suave descartava a colocação intravascular, após o qual o volume especificado de carragenina ou salina era devidamente injetado.



Figura 04. Procedimento de injeção da carragenina.

3.3 Avaliação de hipernocicepção mecânica

A hipernocicepção mecânica na ATM foi avaliada através da medição do limiar de intensidade de força (em gramas) necessária para provocar uma reação de retirada da cabeça, aplicado na região da ATM esquerda, para a ocorrência da resposta reflexa de retirada da cabeça do animal. As medições foram realizadas por um examinador que desconhecia os tratamentos, fazendo uso de um dispositivo digital o qual media a força aplicada (Analgesímetro Digital; Insight, Ribeirão Preto, SP, Brasil).

Cada animal foi alojado em uma caixa de plástico individual durante 30 minutos antes do início dos testes comportamentais, e foram submetidos a uma sessão de condicionamento de medições de limiar de retirada da cabeça na sala de prova durante três dias consecutivos com temperatura controlada e baixa iluminação e ruído. No terceiro dia, o valor do limiar basal de força foi registrado antes das injeções i.art. de carragenina ou veículo. A medição dos limiares de força foram realizados (em triplicado) de ATM do lado esquerdo 4, 6, 12, 24, 48, 72, 168 h após injeção de Cg e os valores obtidos em cada ponto do tempo foram obtidos em média aritmética (DENADAI SOUZA et al., 2009).

Para cada experimento, o limiar de retirada da cabeça foi avaliado antes da indução da hipernocicepção artrítica (valores basais), ou seja, antes da indução do

tratamento com carragenina, e após a hipernocicepção ter sido induzida pela injeção de carragenina, sendo essas avaliações realizadas uma vez por dia após 24 horas da injeção de carragenina.

3.4 Coleta do lavado articular

Os animais receberam a injeção intrarticular de uma solução de 10 µl de carragenina (5%) na ATM esquerda. Após 4, 6 ou 12 horas os animais foram anestesiados com hidrato cloral e sacrificados por exsanguinação. A pele e o músculo temporal eram removidos para evidenciar a articulação e, em seguida, foi realizada a lavagem da cavidade articular. O lavado foi obtido através da injeção e aspiração de um volume final de 100 µL (2 x 50 µL) de solução fisiológica e heparina (5 U/mL) com o emprego de seringas de insulina *ultrafine* 29G (BD). As alíquotas eram colocadas em tubos ependorfs, das quais retirou-se amostras a serem analisada microscopicamente fazendo-se a contagem total e diferencial do número de células presentes no exudato articular.

3.5 Extração dos núcleos espinhais trigeminais (Sp5C)

Com o tempo de 120 horas (para o grupo de animias depletados de magnésio) ou 168 horas (para grupo com suplementação de cloreto de magnésio) após a injeção de carragenina na ATM, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de tribromoetanol 2,5% (250 mg/kg) e perfundidos com paraformaldeído 4% transcardiacamente em tampão fosfato 0,1M (pH7,4).

O cérebro foi rapidamente removido, sendo separado o tronco da medula e, posteriormente, foi fixado em formalina 4% por 60-90 min para cortes longitudinais de 10 mm para ensaio de imuno-histoquímica.

Outros grupos de animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de hidrato de cloral (0,03 mg/kg) e decapitados. O cérebro e tronco cerebral foram rapidamente removidos e as áreas dos núcleos do trigêmeo foram dissecadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e, em seguida, mantidos congelados em -80 ° C até o processamento adicional para RT-PCR. As seções utilizadas neste

estudo foram cortadas do bregma milímetros -10,5 para -14,04 mm (PAXINOS & WATSON, 1997), abrangendo toda a área onde o sistema trigêmeo (subnúcleo oral, interpolar e caudal do complexo trigeminal).

A área a ser retirada foi inicialmente localizada através de estereotaxia, utilizando um atlas de cérebro de rato para obter as coordenadas sobre o ponto referente ao subnúcleo caudal trigeminal. No momento da identificação da região também tomamos um ponto de referência que fosse de fácil identificação para reproduzir em outros cortes (Figura 05).

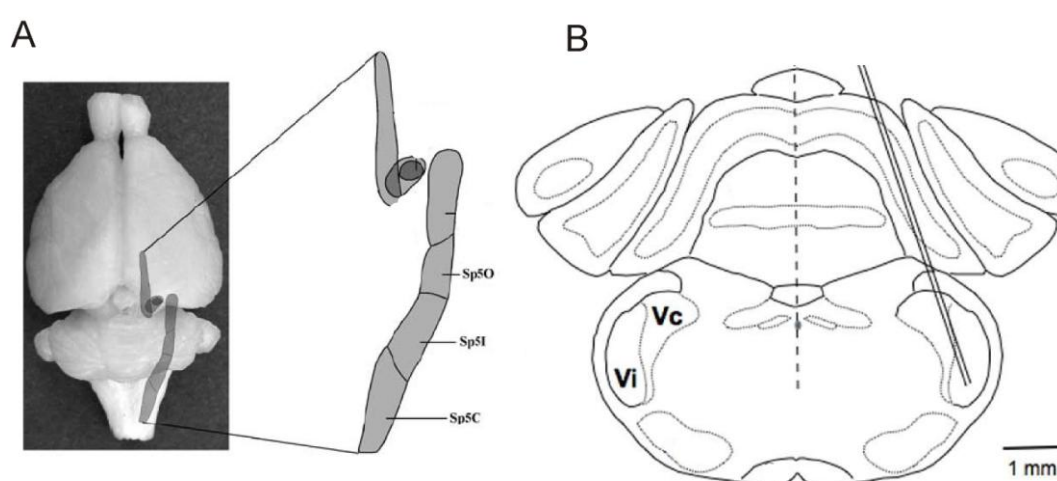


Figura 05: Localização estereotática do subnúcleo caudal. (A) Visão dorsal do cérebro do rato evidenciando os subnúcleos espinhais trigeminais. (B) Ilustração da implantação da canula de injeção na região Sp5c para sua localização através de estereotaxia. Vc, subnúcleo caudal; Vi, subnúcleo interpolar.

3.6 Indução da deficiência de Mg em ratos

Animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos (normais e depletados). Os grupos de ratos depletados foram alimentados *ad libitum* por um período de 9 dias com uma dieta sintética sem magnésio e água deionizada, a qual também foi fornecida à vontade durante o mesmo período. A dieta sintética sem magnésio continha (g/kg): amido de milho (397), caseína (200), sacarose (100), óleo de soja (70), Fibra (50), L-cistina (3), bitartarato de colina (2,5), AIN-93VX *mix* de vitaminas (10), Mg-

freemineral mix (35), (AIN93 magnésio livre, Rhoister São Paulo, Brasil). Após 9 dias os animais receberam injeção cg i.art. na ATM esquerda e a dieta especial continuou sendo administrada por mais 5 dias, quando os animais foram sacrificados.

A avaliação dos limiares de retirada da cabeça (hipernocicepção mecânica) foi realizada antes do início da dieta especial e repetida após 9 dias de alimentação com esta dieta. O grupo controle foi alimentado com dieta normal e também foi submetido às mesmas condições dos animais que receberam a dieta especial.

Para verificar a depleção de magnésio, as concentrações séricas foram determinadas antes e após 9 dias de alimentação dieta especial, como descrito a seguir.

3.7 Suplementação de magnésio

Suplementação de magnésio foi realizada pela administração oral de cloreto de magnésio ($MgCl_2$) dissolvido na água mineral em um grupo diferente de animais, os quais tinham alimentação normal e receberam injeção i.art de carragenina 5% na ATM esquerda. Foram testadas as doses de 10 mg/kg, 30 mg/kg e 90 mg/kg por dia, e essas doses foram administradas via oral, através de gavagens, em um volume de 0,5 ml, duas vezes por dia por um período de 3 dias. A dose de melhor efeito foi utilizada nos protocolos com pré-tratamento de 5 dias e 7 dias antes da injeção de carragenina. O tratamento com $MgCl_2$ foi continuado após a injeção de carragenina até o 7º dia. A figura 06 mostra o protocolo experimental de suplementação.

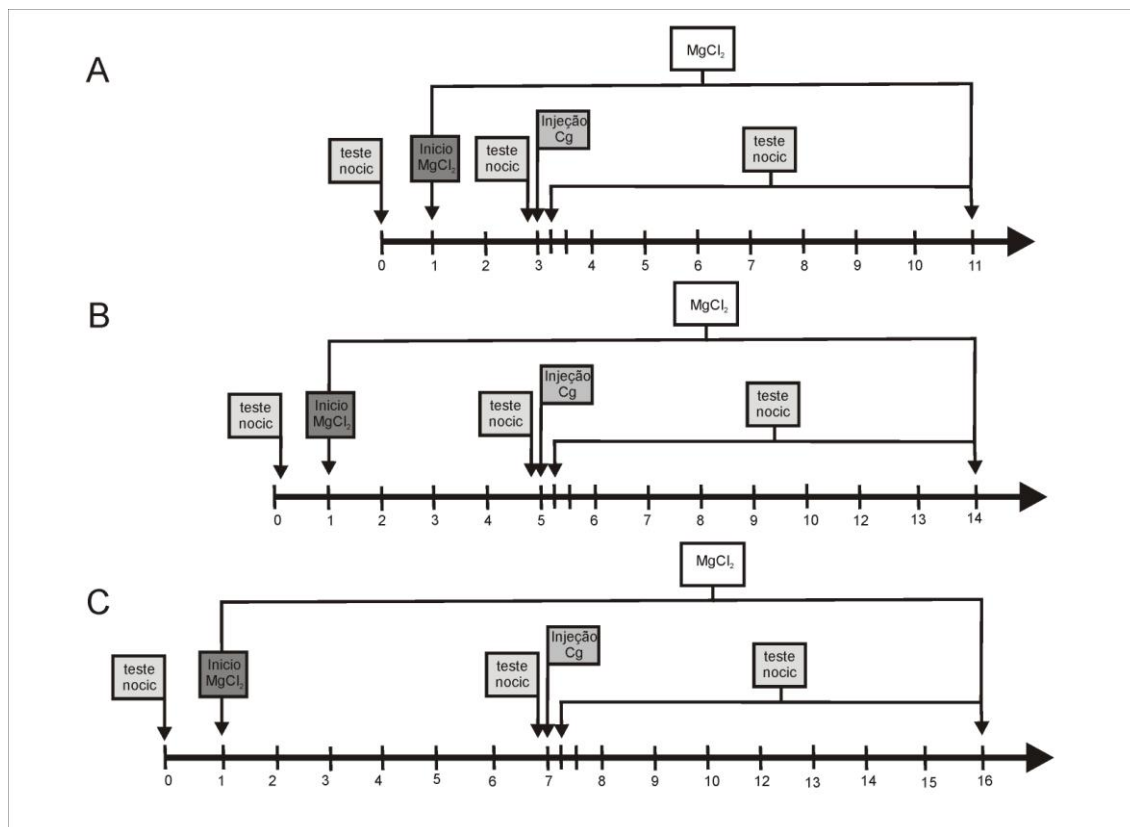


Figura 06. Esquema ilustrativo do protocolo experimental de suplementação com o Cloreto de magnésio ($MgCl_2$).

3.8 Determinação do nível de magnésio no soro

Os animais foram anestesiados com tribromoetanol 2,5% (250 mg / kg de peso corporal, ip). O sangue foi coletado do plexo venoso orbital em tubos heparinizados antes da suplementação com cloreto de magnésio e da administração de ração sem magnésio, também foi medido após 07 dias após a suplementação e da indução da deficiência de magnésio. Amostras de soro foram obtidas após uma centrifugação a baixa velocidade (2.500 rpm por 15 min) e um kit de diagnóstico normalizado por LABTEST-Magnésio ®, e um espectrofotômetro foi usado na determinação spectrophotometria do magnésio sérico em 540 nm.

3.9 Drogas utilizadas e tratamento

O bloqueio farmacológico do receptor NMDA foi realizada por uma única administração intraperitoneal do antagonista do receptor, MK-801 (0,1 mg/kg; 0,25

mg/kg e 0,5 mg/kg) 30 min antes da injeção de carragenina. O limiar nociceptivo foi medido antes e depois (4, 6, 10, 24 - 168 horas) da injeção de carragenina.

3.10 Imunohistoquímica do tecido extraído do subnúcleo trigeminal da região Sp5c

Os animais foram anestesiados com pentobarbital (60 mg/kg; i.v.) e depois perfundidos com 100 ml de salina heparinizada, seguido de uma solução contendo paraformaldeído 4%, em 0.1M de tampão fosfato (PBS) (pH 7,4). O tronco encefálico e a medula espinhal superior foram removidos e fixados por 24 hora em formol, depois foram desidratados e parafinizados para a realização de cortes histológicos a nível da porção caudal do núcleo trigeminal espinhal. Foi realizado ensaio imunohistoquímico específico para a detecção da expressão da subunidade NR1 do receptor NMDA segundo a metodologia descrita em Vale *et al.* (2006).

3.11 Isolamento do RNA total

O subnúcleo caudal do trigêmeo de rato adulto macho foi obtido de cada animal. A quantidade média de tecido isolado de cada amostra de animais foi de ~ 100 mg tecidos. Os tecidos foram pesados e armazenados a -80 ° C até ser utilizado para a análise. RNA total foi isolado de cada amostra usando o *kit Mini RNeasy* (Qiagen, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

Resumidamente, a trituração e homogeneização da amostra foi realizada no QIAzol™ lise reagente (Qiagen, EUA) usando um disruptor de células composto por uma ferramenta de velocidade rotatória (Dremel 300-N/10, México) e lâminas de aço autoclaváveis (*design* próprio). Após ruptura da membrana e a liberação de ácido nucléico para o meio, a solução foi centrifugada a 20.000 g por 5 min, e em seguida, foram adicionado 200 µL de 1-Brom-3-cloro-propano (BCP - Fluka, EUA) para o sobrenadante. Após homogeneização e centrifugação (15.000 g, 15min, 4°C) o conteúdo do tubo de 2 mL é separada em três fases, e os RNAs impuros são encontrado na fase límpida superior. Os passos a seguir consistem na montagem do RNA impuro em uma coluna de rotação, a fim de remover as impurezas, utilizando etanol a 70%, e RW1 e

buffers RPE. A eluição de alta pureza de ácidos nucleicos ocorre em RNase água. O RNA obtido é quantificado em um NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, EUA).

3.12 Reação de transcriptase reversa

Para avaliar a expressão gênica de NMDA-1, 2 e 3, a RNA isolado foi transformado em cDNA por uma reação de transcriptase reversa usando um *SuperScript™ reverssa III Transcriptase System* (Invitrogen, EUA). Resumidamente, as amostras de RNA (1 mg) foram incubadas com 4µl de *iScript 5X™ Mix Reação* e 1µl de *iScript™* transcriptase reversa (Bio-Rad, EUA) em água *Milli-Q* para um volume final de 20 ml. Esta reação foi ciclada a 25 ° C por 5 min, 42 ° C por 30 min, e 85 ° C por 5 min. O cDNA sintetizado foi mantido em um freezer a -20 ° C até a sua amplificação por real-time polymerase chain reaction (PCR - *Reverse transcription polymerase chain reaction*/ Transcrição reversa da reação da cadeia de polimerase).

3.13 PCR em tempo real (RT-PCR)

A expressão gênica de NMDA-1, 2 e 3 foi ensaiada usando um *iQ5 Real-time PCR Detection System* (Bio-Rad, EUA). A Fosfolipase A2 (3-monooxygenase/tryptophan tirosina 5 monoxigenase ativação da proteína zeta polipeptídeo) foi usada como o gene referência (YHWAZ). *Primers* DNA para todos os genes (Tabela 1) foram projetados com base em seqüências de RNA mensageiro obtido a partir do Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>; acessada 04 de junho de 2010). Ensaio de PCR em tempo real foram realizadas em um volume final de 25 mL de um meio contendo 12,5 *mLiQ Supermix* (*buffer* padrão para amplificação com reagentes tais como DNA polimerase, dNTPs, tampão e solução salina em concentrações ideais para real-time PCR ensaios), 200 nM *primers*, e 2 mL de cDNA das amostras. Amostras negativas também foram testados, com o cDNA sendo substituídos por autoclavado água *Milli-Q*. As condições de PCR foram as seguintes: um período de desnaturação inicial de 3 min a 95 ° C, seguido por 40 ciclos de amplificação do gene. Cada ciclo consistiu de uma fase de desnaturação inicial de 30 s em 95 ° C, seguida por uma fase de anelamento de 30 s em

61 ° C e uma fase de extensão de 45 s em 72 ° C. As amostras foram então submetidos a uma etapa de extensão de 3 min a 72 ° C.

Para garantir a especificidade da amplificação aplicada (ie, para determinar se os produtos formados são específicos para os genes testados), construímos uma curva de fusão (isto é, uma curva de fusão) após cada reação, em que a temperatura da reação foi posteriormente aumentado 1° C a cada 20 s, começando na temperatura de emparelhamento de uma cartilha e terminando em 95° C. Todo o processo de construção da curva, as mudanças na fluorescência, foram medidos, e os dados obtidos com o software Sistema iQ5 *Optical* (versão 2.0; Bio-Rad) foram baseados nos valores do ciclo limite, em que a fluorescência observada é de 10 vezes maior do que a fluorescência basal para cada ensaio de PCR. Expressão gênica foi obtida pela aplicação do método matemático de Pfaff *et al.* (1999).

3.14 Análise estatística

Os resultados são expressos como a média \pm E.P.M. das medidas a partir de, pelo, menos seis animais por grupo. Análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey serviram para comparação de médias. Teste t de Student foi utilizado para comparar duas médias. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

RESULTADOS

4. Resultados

4.1 Evolução temporal do efeito hipernociceptivo da artrite da ATM induzida por carragenina

A injeção intra-articular de uma única dose de carragenina 5% resultou em estado de hipernocicepção local prolongada, tempo-dependente, sensível ao estímulo mecânico do Von Frey, mostrado por uma clara diminuição no limiar de retirada da cabeça.

A hipernocicepção induzida pela carragenina teve seu começo na 4^a hora ($p < 0.001$, controle salina vs. carragenina 5%), tendo seu pico entre a 6^a e a 12^a hora ($p < 0.001$) e durou até a 144^a hora ($p < 0.05$), retornando a níveis basais na 168^a hora.

Particularmente os animais que receberam injeção intra-articular de salina, na ATM esquerda, não apresentaram nenhuma diferença significativa, quando comparados o limiar antes da injeção de carragenina, e o limiar de retirada da cabeça observado ao longo de tempo (Figura 07).

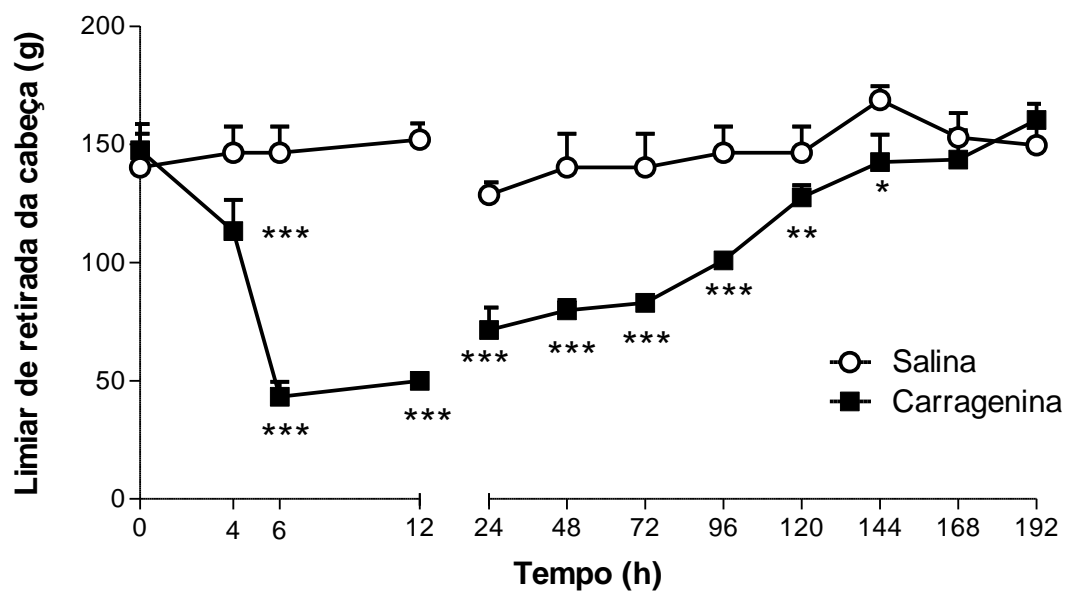


Figura 07. Evolução temporal do efeito hipernociceptivo da artrite induzida por carragenina da ATM. Salina (10 μ l) ou carragenina (5%, 10 ml) foi injetada intrarticular na ATM esquerda de ratos. O limiar nociceptivo (de retirada da cabeça) foi medido antes e depois (4-192 horas) à injeção por estimulação mecânica. Os pontos representam a média \pm E.P.M. do limiar da força em gramas de seis animais por grupo. Asteriscos indicam diferenças significativas (t Student, *** P <0,001, ** P <0,01 e * P <0,05) em relação ao grupo salina.

4.2 Intensidade de influxo celular induzido por carragenina na cavidade articular da ATM de ratos

Na sexta hora após a injeção de carragenina, observou-se aumento significativo no número de células inflamatórias ($p < 0,01$), o que demonstra uma atividade de recrutamento celular, condizente com um processo inflamatório clássico causada pela carragenina na ATM (Figura 08).

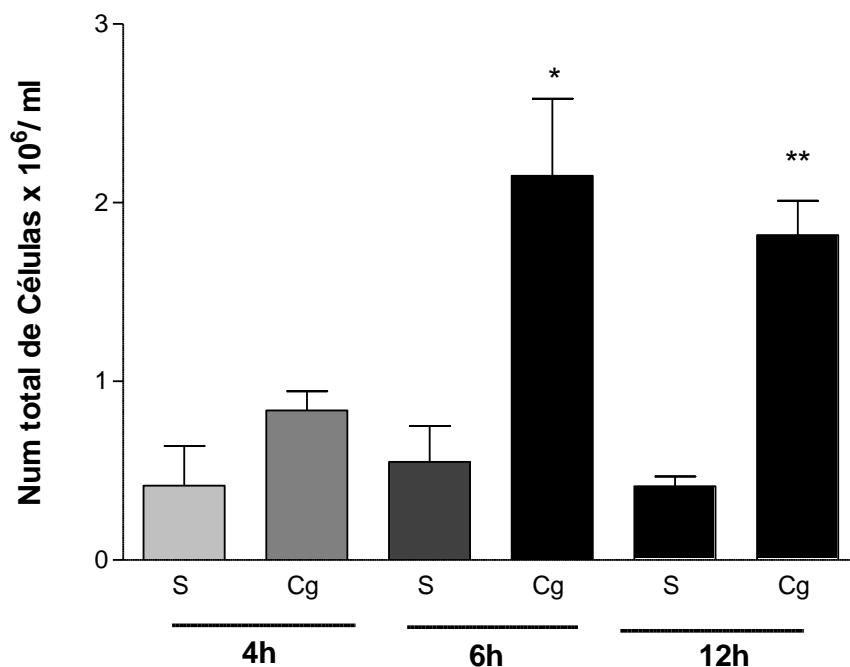


Figura 08. Intensidade de influxo celular induzida pela carragenina na cavidade articular da ATM de ratos. A carragenina (5 % ; 10 μ l) foi injetada via intrarticular na ATM esquerda de ratos Wistar. A ATM injetada foi lavada e o exudato articular foi coletado na 4^a, 6^a e 12^a hora após a injeção. O grupo controle recebeu veículo (salina no mesmo volume de injeção). Os resultados são apresentados como média + E.P.M. do número total de células x 10⁶ /ml. Asteriscos indicam a diferença significativa (test T student, ** p<0,01 e * p<0,05 em relação ao grupo salina).

4.3 Efeito do antagonista do receptor NMDA na hipernociceção orofacial induzida por carragenina.

Nós investigamos o papel dos receptores NMDA no efeito nociceptivo da artrite da ATM induzida por carragenina. Com esse propósito, decidimos investigar o efeito do pré-tratamento com MK-801 (0,1; 0,25 ou 0,5 mg/kg, i.p.) um antagonista do receptor NMDA. Nossos resultados mostraram que MK-801 na dose de 0,5 mg/kg e 0,25 mg/Kg produziram, de forma dose-dependente um aumento no limiar de retirada da cabeça (Figura 09).

Na 4^a hora após a injeção de carragenina, nenhum efeito significativo do MK-801 foi observado quando comparado com o grupo controle. O limiar de retirada da cabeça teve um aumento a partir da 6^a hora (pico da hipernociceção da carragenina) ($P < 0,001$), levando a perceber que o efeito do MK-801 se deu, provavelmente, apenas depois da 5^a hora após a administração dessa droga, haja vista que foi administrado meia hora antes da injeção de carragenina.

A dose de 0,5 mg/kg alcançou seu efeito inibitório máximo, tendo uma taxa de 145% de inibição da hipernociceção, na 48^a hora ($p < 0,001$) e durou até a 120^a hora ($p < 0,05$) após a injeção de carragenina, podendo ter uma duração maior se considerarmos que os animais com inflamação já reduzem naturalmente a nociceção (Figura 09).

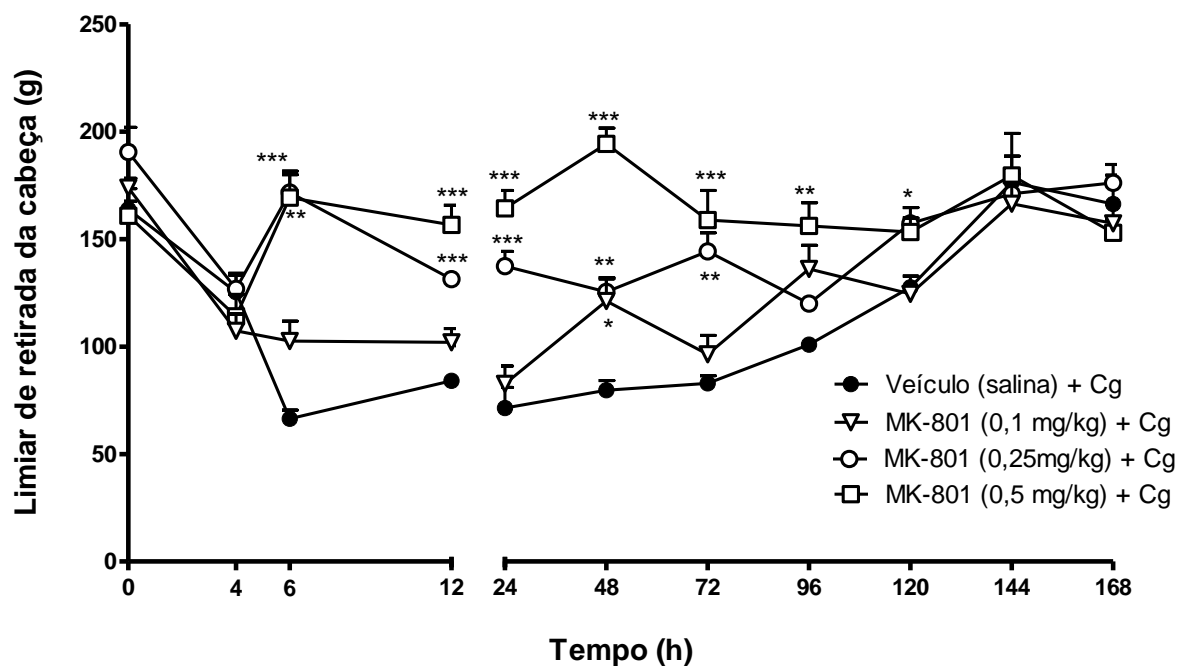


Figura 09. Avaliação do efeito antihipernociceptivo do antagonista do receptor NMDA, MK-801, em artrite induzida por carragenina na ATM. MK-801 (0,1 , 0,25 ou 0,5 mg/kg) ou veículo (salina) foi injetado ip 30 min antes da injeção de carragenina intrarticular (5%, 10 μ l) na ATM esquerda. O limiar nociceptivo de retirada da cabeça foi medido antes e depois (4-168 horas) da injeção por estimulação mecânica do von Frey eletrônico. Os pontos representam a média \pm E.P.M. do limiar da força em gramas de seis animais por grupo. Asteriscos indicam diferenças significativas (ANOVA seguido por teste de Bonferroni, *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$ e * $P < 0,05$ em relação ao grupo salina).

4.4 Efeito da suplementação oral do cloreto de magnésio na hipernocicepção orofacial induzida por carragenina.

Primeiramente foi desenhado um experimento com o objetivo de encontrar a dose de $MgCl_2$ com efeito anti-nociceptivo. Foram testadas a administração de três doses 10 mg/kg, 30 mg/kg e 90 mg/kg (12/12 h; 3 dias de pré-tratamento). Esses resultados mostraram um efeito dose dependente da inibição hipernociceptiva pelo $MgCl_2$, sendo a dose de 90mg/kg a que melhor inibiu a hipernocicepção de maneira significativa na 4^a, 6^a, 24^a, 120-168^a hora após a injeção de carragenina, apresentando um inibição de 53% na 6^a hora ($p<0,001$). Interessantemente, depois de 3 dias de pré-tratamento com $MgCl_2$, o grupo que recebeu a dose de 90 mg/kg, mostrou um aumento significativo de 26% no limiar de retirada da cabeça ($p<0,01$), mesmo antes da injeção de carragenina quando comparado com o grupo controle (Figura 10).

Utilizando a dose de 90 mg/kg avaliamos o curso do tempo de pré-tratamento com $MgCl_2$. Nossos resultado mostraram um progressivo aumento no limiar de retirada da cabeça em 5 e 7 dias de pré-tratamento, o qual foi significativamente maior ao longo do tempo de desenvolvimento da hipernocicepção até a retomada de valores basais desse limiar. Pudemos observar uma inibição desse limiar, na 6^a hora após a injeção de carragenina, cerca de 47% nos animais com 5 dias de pré-tratamento $MgCl_2$ (Figura 11A) , e de 105% nos animais com 7 dias de pré-tratamento com $MgCl_2$, quando comparado com o grupo de animais que receberam apenas injeção de carragenina ($p<0,001$) (Figura 11B).

Para verificar a concentração plasmática de magnésio nos ratos que receberam a suplementação de $MgCl_2$, procuramos determinar a concentração plasmática de magnésio no soro no 3^o, 5^o e 7^o dia após o início da suplementação de $MgCl_2$, antes da injeção de carragenina. Observou-se que o nível plasmático do magnésio foi significativamente maior em todos os grupos tratados, subindo até 54% no 7^o dia, quando comparado aos valores basais na determinação sérica de magnésio nos animais antes da suplementação (Figura 11C).

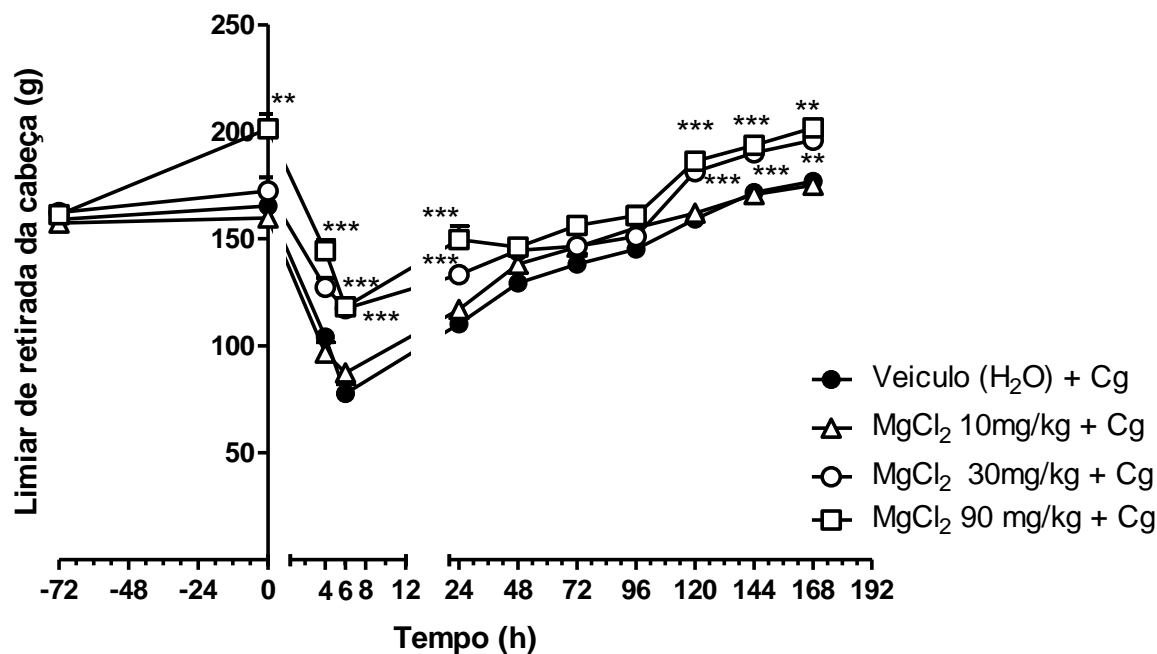


Figura 10. Efeito antihipernociceptivo do cloreto de magnésio (MgCl₂) na artrite induzida por carragenina na ATM. Veículo (H₂O) ou MgCl₂ (10, 30 ou 90 mg / kg) foi administrado por via oral durante 3 dias (12/12 h) antes da injeção de carragenina intrarticular (5%, 10 μ l) na ATM esquerda e também depois da injeção, até a 168^a hora. O limiar nociceptivo de retirada da cabeça foi medido antes e depois (4-168 horas) da injeção por estimulação mecânica. Os pontos representam a média \pm E.P.M. do limiar da força em gramas de seis animais por grupo. Asteriscos indicam diferenças significativas (ANOVA seguido por teste de Bonferroni, *** P <0,001, ** P <0,01 e * P <0,05 em relação ao controle).

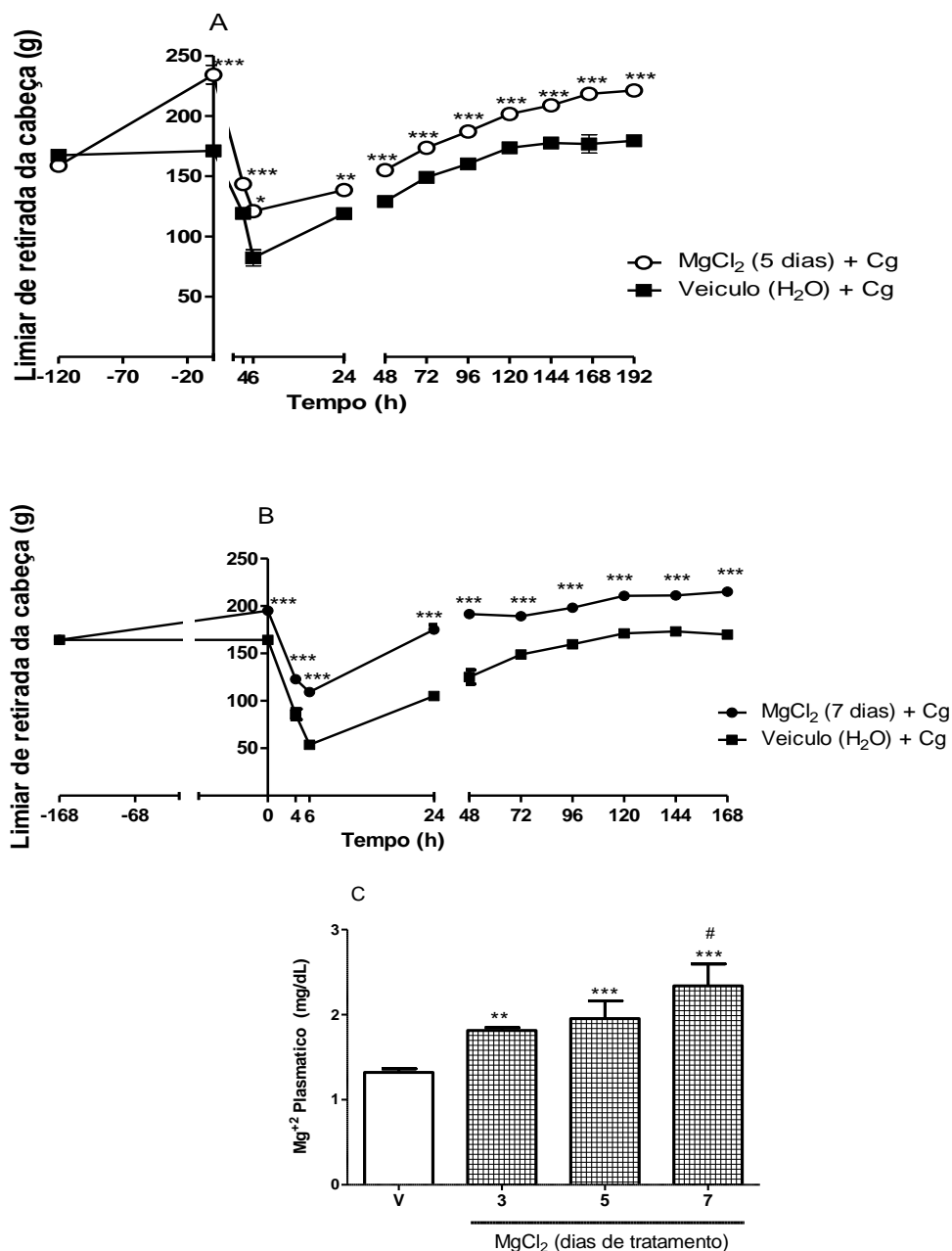


Figura 11. Evolução temporal do efeito antihypernociceptivo do Cloreto de Magnésio (MgCl₂) na artrite induzida por carragenina na ATM de ratos. Veículo (V; H₂O) ou MgCl₂ (90 mg / kg) administrado via oral, por 5 (Painel A) e 7 (Painel B) dias (12/12 h) antes da injeção de carragenina intrarticular (5%, 10 μ l) na ATM esquerda e após a injeção de carragenina até a 168^a hora. O limiar nociceptivo de retirada da cabeça foi medido antes e depois (4-168 horas) da injeção através da estimulação mecânica. Os pontos representam uma média \pm SEM do limiar da força em gramas de sete animais por grupo. Asteriscos indicam diferenças significativas (ANOVA seguido Por Teste de Bonferroni, *** P <0,001, ** P <0,01 e * P <0,05 em relação ao controle). (Painel C) nível plasmático sérico de magnésio em ratos alimentados com dieta normal (DN) e suplementado com MgCl₂, após 3,5 e 7 dias. Animais foram tratados com Veículo (V) ou cloreto de magnésio (MgCl₂; 90mg/kg; 12/12h). Os resultados são apresentados como média \pm E.P.M. do magnésio plasmático (mg / dl de sangue). Asteriscos indicam diferenças significativas (teste t de "intervalo de confiança de 95%, *** P <0,001, ** P <0,01 e * P <0,05 em relação ao veículo) (# P <0,05 5 x 7 dias de tratamento).

4.5 Efeito da deficiência de magnésio na hipernocicepção induzida por carragenina.

Após 9 dias do começo da administração de uma dieta sem magnésio, os animais mostraram uma significativa diminuição do limiar de retirada da cabeça ao estímulo mecânico do Von Frey, em cerca de 18,8% ($p < 0,001$) quando comparado com o grupo que recebeu uma dieta normal (Figura 12B), o limiar de retirada da cabeça foi realizado antes e depois da injeção de carragenina.

O magnésio plasmático também foi medido para avaliar se realmente foi alcançado o resultado de depleção, e observamos que após 9 dias de administração de ração especial esses animais, como esperado, obtiveram uma significativa diminuição na concentração do magnésio plasmático, cerca de 72%, quando comparado ao grupo controle, os quais receberam ração normal (Figura 12A).

Quatro horas depois da injeção de carragenina, nós observamos diferença entre o grupo tratado com ração normal e o grupo tratado com ração depletada, efeito esse, que durou até a sexta hora (efeito Máximo de diferença do limiar nociceptivo ; $p < 0,001$), tendo essa diferença desaparecido na 24^a hora. Curiosamente, após 96 horas da injeção de carragenina ($p < 0,05$), essa diferença ressurgiu, sendo mantida até a 120^a hora ($p < 0,001$) de forma significativa (Figura 12B).

O pré-tratamento com MK-801 (0,5 mg/kg) exerceu um efeito preventivo no desenvolvimento da hipernocicepção medida pelo limiar de retirada da cabeça, mostrando um efeito preventivo na diminuição desse limiar causado pela depleção do magnésio conjuntamente à injeção de carragenina ($p < 0,001$) ou somente pela depleção do magnésio. O efeito máximo do MK-801 foi cerca de 100% ($p < 0,001$) de inibição da hipernocicepção causada pela injeção de carragenina e pela depleção de magnésio (Figura 12B).

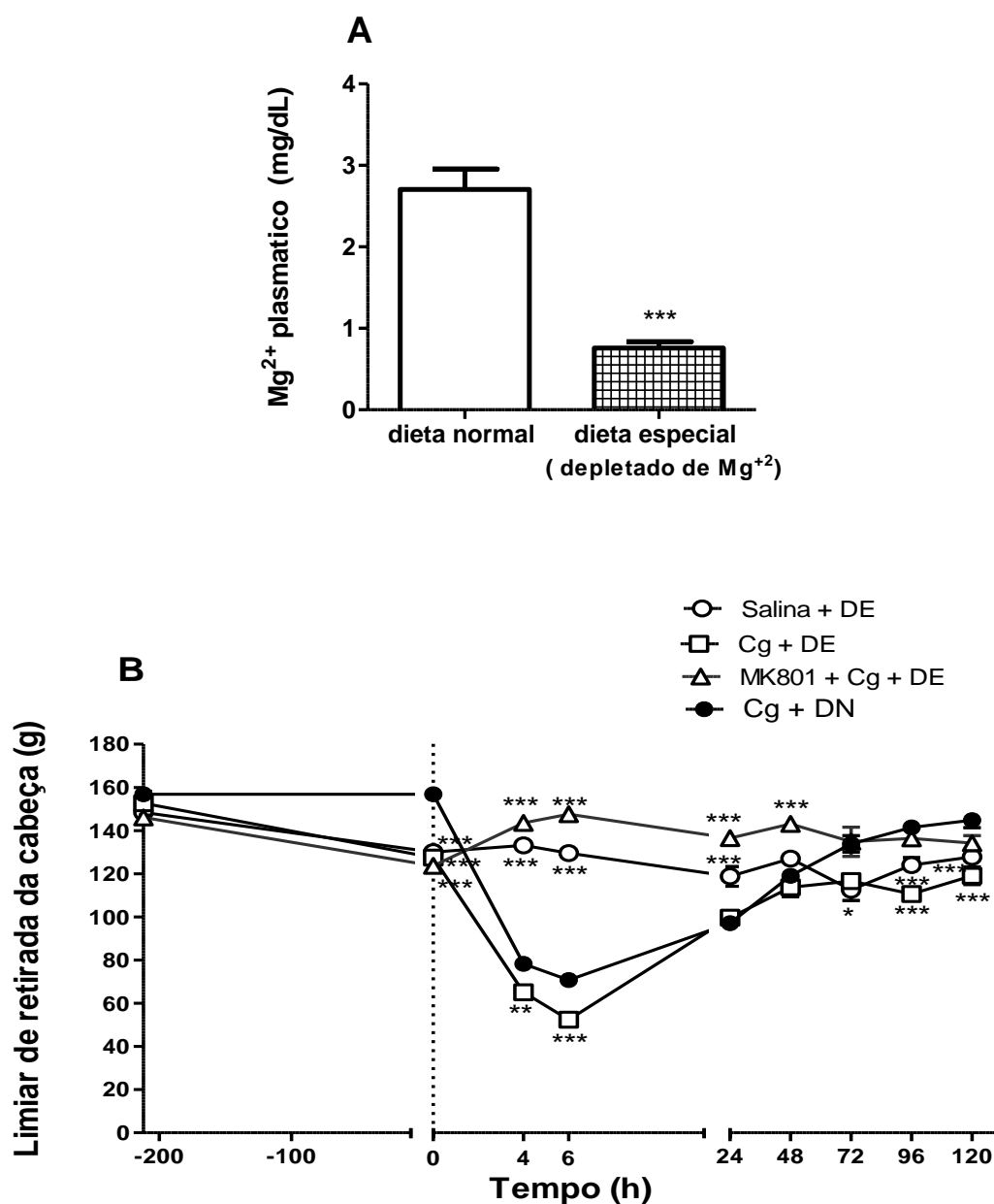


Figura 12. Efeito da deficiência de magnésio (9 dias) na hipernociceção induzida por carragenina. A dieta especial livre de magnésio foi administrada por 9 dias antes da carragenina e durante todos os outros dias do experimento. (A) nível plasmático sérico de magnésio em ratos alimentados com dieta normal (DN) e dieta especial (DE) (livre de magnésio), após 9 dias. (B) Carragenina (5%, 10 μ l) foi injetada intrarticular na ATM esquerda de ratos. O limiar nociceptivo foi medido antes e depois (4-120 horas) da injeção de carragenina por processos de estimulação mecânica eletrônica (von Frey). Os resultados são apresentados como média \pm E.P.M. do magnésio plasmático mg/dl de sangue (A) ou o limiar de força em gramas (B). Asteriscos indicam diferenças significativas (ANOVA seguido de Bonferroni, *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$ e * $P < 0,05$).

4.6 Imunohistoquímica para a subunidade NR1 fosforilada de tecido do subnúcleo caudal (Sp5C) de ratos.

Pela análise imunohistoquímica do tecido retirado da região do subnúcleo caudal podemos sugerir que houve um aumento da subunidade NR1 fosforilada nessa região em animais com artrite induzida pela carragenina (Figura 13C) quando comparada com os animais controle que receberam apenas o veículo (*Naive*) (Figura 13B). O tratamento com a suplementação de $MgCl_2$ revelou uma diminuição da imuno-marcação quando comparada com o grupo de animais com artrite não tratados com a suplementação com $MgCl_2$.

Podemos perceber, através da observação da figura 13D (contendo fotomicrografias representativas das lâminas), pela intensidade e quantidade de células de coloração mais escurecida, que a carragenina revelou um possível aumento na fosforilação da subunidade NR1 (Figura 13D).

A deficiência de magnésio aumentou a imuno-marcação tanto no grupo tratado com salina intra-articular e no grupo injetado com carragenina intra-articular (Figuras 13E e 13F).

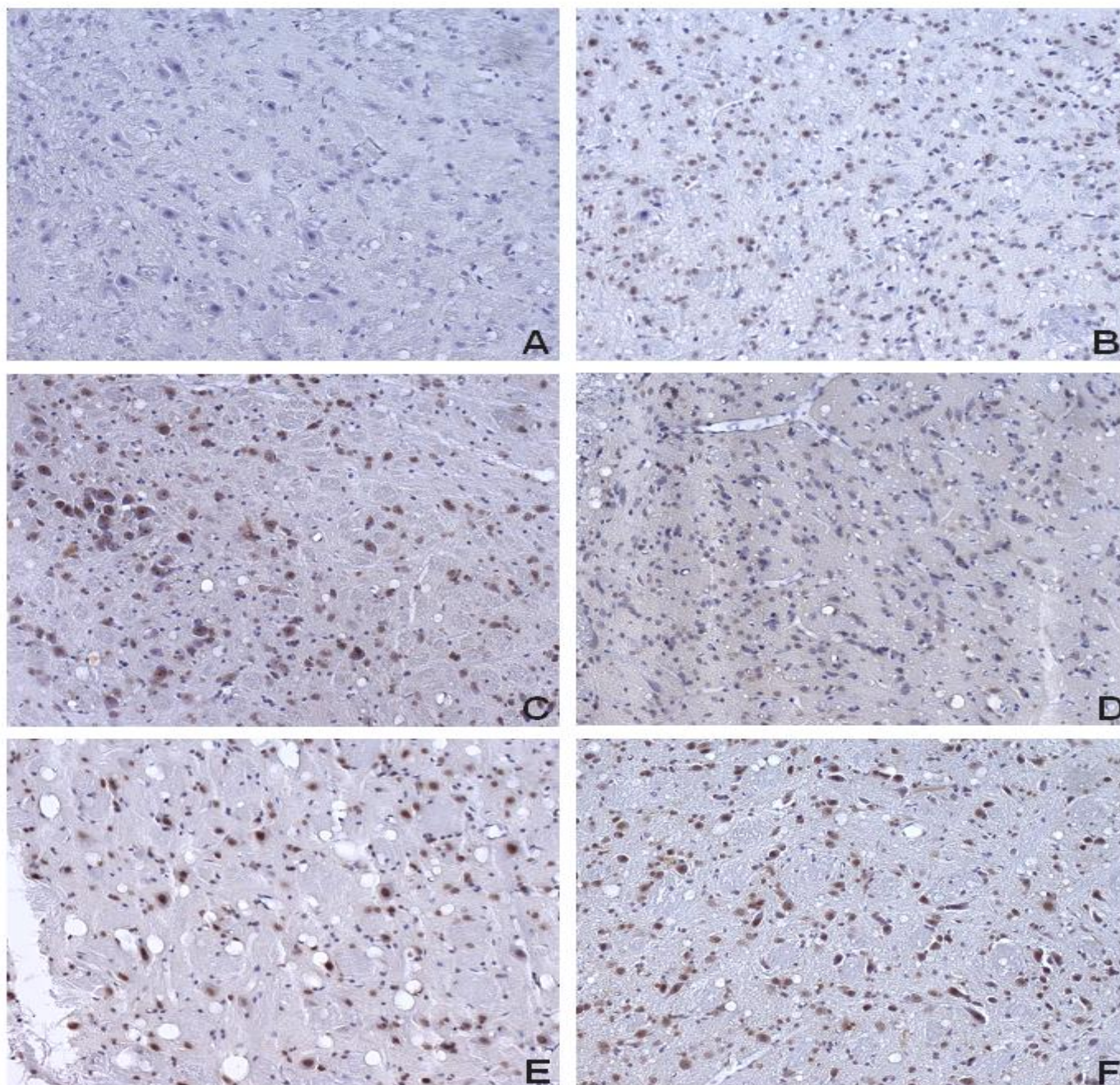


Figura 13. Fotomicrografia da subunidade NR1 fosforilada. Imunomarcação do subnúcleo caudal (Sp5C) em cérebro de rato. A: controle negativo. Ausência de anticorpo primário; B: ratos *Naive* (veículo); C: ratos submetidos a artrite induzida por carragenina na ATM; D: ratos submetidos a artrite na ATM induzida por carragenina e tratados com $MgCl_2$ (90 Mg/kg; 7 dias); E: ratos deficientes de magnésio ; F: ratos deficientes de magnésio submetidos a artrite induzida por carragenina na ATM. Aumento de 200x.

4.7 Expressão relativa de genes de RNAm das subunidades do receptor NMDA em tecido de subnúcleo caudal (Sp5c) de ratos

A expressão relativa quantitativa de três genes relacionados às subunidades do receptor NMDA foi investigada em amostras de tecidos obtidos a partir de subnúcleo caudal do complexo trigeminal de ratos. Os RNAm das subunidades NMDAR1 (NR1), NMDAR2B (NR2B), NMDAR3 (NR3) foram expressos (Figuras 14 e 15), e seus perfis de expressão alterada de acordo com a exposição aos tratamentos de suplementação com $MgCl_2$, ou deficiência de magnésio e indução de uma inflamação da ATM (artrite) com carragenina.

A artrite na articulação temporomandibular induzida por carragenina aumentou significativamente a expressão do RNAm para a subunidade NR1 ($p < 0,05$) quando comparados aos ratos *naive*. O tratamento com a suplementação com $MgCl_2$ não modificou a expressão NR1 quando comparado ao grupo não tratado, pois não apresentou diferença significativa quando comparados ao grupo *naive* ($p < 0,05$; Figura 14A).

Com relação à subunidade NR2B não houve diferenças entre o grupo *naive* e o grupo com artrite induzida por carragenina. Embora tenha havido uma diminuição na expressão dessa subunidade em ratos artríticos tratados com a suplementação de $MgCl_2$, quando comparado com o grupo *naive* ($p < 0,05$; Figura 14B).

O estudo da expressão NR3 mostrou que esta subunidade sofreu pouca alteração, mas essa alteração foi significativa no grupo com artrite induzida por carragenina, quando comparado aos animais *naive* ($p < 0,05$; Figura 14C) e o tratamento com suplementação de $MgCl_2$ aumentou significativamente também a expressão dessa subunidade ($p < 0,05$; Figura 14C).

A deficiência de magnésio mostrou um aumento significativo na expressão do NR1 ($p < 0,05$) quando comparado aos animais *naive* (Figura 15A). Embora, quando a artrite por carragenina é induzida na ATM em animais deficientes de magnésio, a

expressão do NR1 diminui em relação ao grupo *naive* ($p < 0,05$; Figura 15A). A expressão da subunidade NR3 pareceu acompanhar o aumento da subunidade NR1, estando supra-regulada, também na deficiência de magnésio (Figura 15C).

Resumindo: a injeção de carragenina em animais deficientes de magnésio diminui a expressão da subunidade NR1. No que diz respeito à subunidade NR2B a deficiência de magnésio não modificou a expressão desta subunidade nem em animais com artrite nem em animais sem artrite da ATM (Figura 15B). A subunidade NR3 mostrou-se significativamente supra-regulada em animais deficientes de magnésio ($p < 0,05$) sem diferenças entre grupo injetado com carragenina e os animais não injetados (Figura 15C).

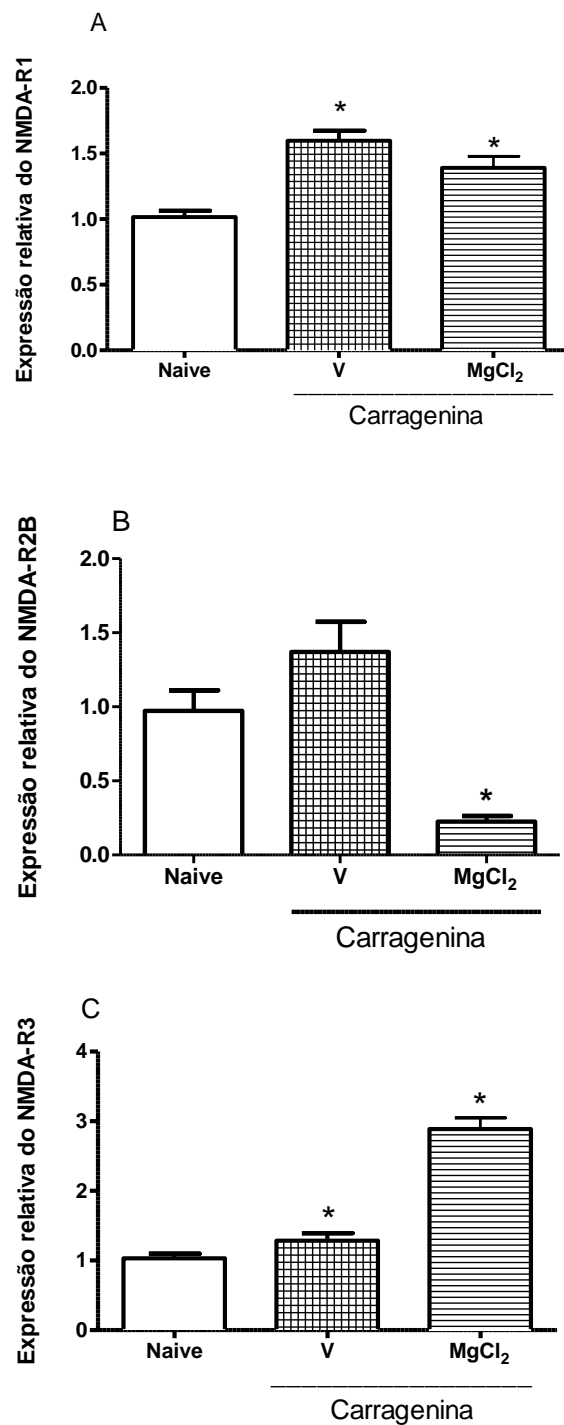


Figure 14. Expressão quantitativa relativa de RNAm dos subtipos R-NMDA NR1 (NMDA1), NR2B (NMDA2) e NR3 (NMDA3) em amostras do subnúcleo caudal de ratos artríticos tratados com cloreto de magnésio. Água (V; veículo) ou MgCl₂ (90 mg/kg) foi administrado por via oral durante 7 dias (12/12 h) antes da injeção de carragenina intrarticular (5%, 10 μ l) na ATM esquerda. A expressão dos genes NR1, NR2B e NR3 foi avaliada em amostras da região do subnúcleo caudal do complexo trigeminal. Os dados são apresentados como médias \pm DP de 4 animais. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle (*Naive*, *Holm-Sidak* teste).

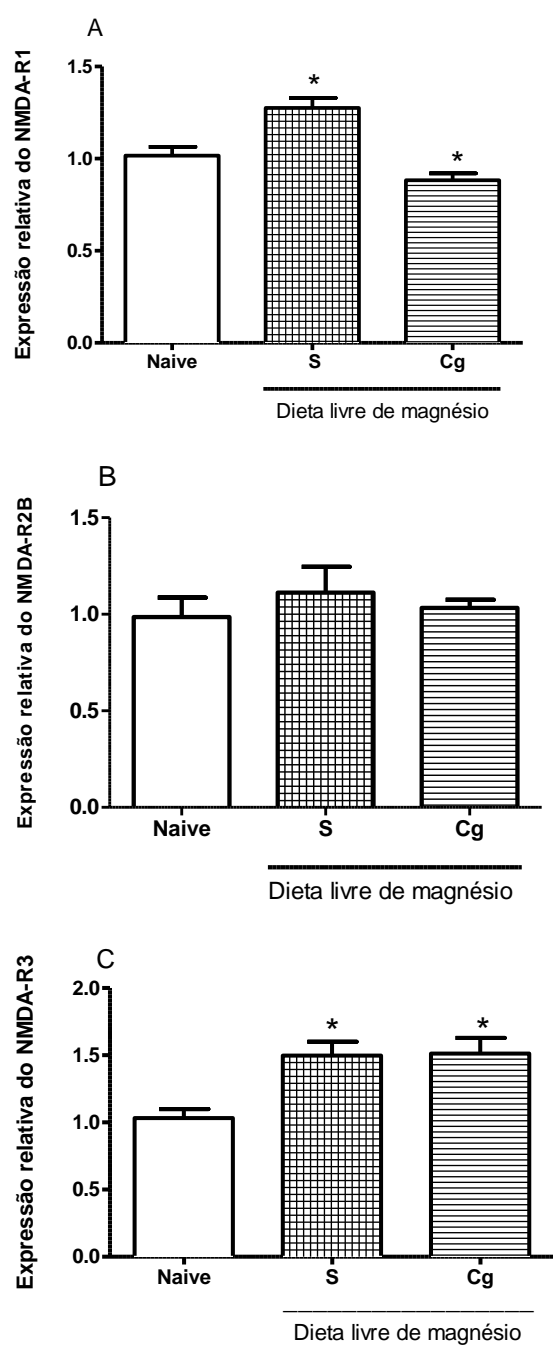


Figura 15. Expressão quantitativa relativa de RNAm dos subtipos R-NMDA, NR1 (NMDA1), NR2B (NMDA2) e NR3 (NMDA3) em amostras do subnúcleo caudal de ratos artríticos com deficiência de magnésio. Salina (S) ou carragenina (Cg, 5 %, 10 μ l) foi injetado intrarticular na ATM esquerda de ratos alimentados com dieta livre de magnésio. O grupo Naive foi tratado com dieta normal. A expressão dos genes NR1, NR2B e NR3 foi avaliada em amostras da região do subnúcleo caudal do complexo trigeminal. Os dados são apresentados como médias \pm DP de 4 animais. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle (Naive, *Holm-Sidak* teste).

DISCUSSÃO

5. Discussão

As dores orofaciais são oriundas de doenças ou distúrbios funcionais que envolvem o aparelho mastigatório, particularmente a cavidade oral, dentes, maxilares, ATM e os músculos da mastigação. A cavidade oral e sistema mastigatório abrigam diversas funções cotidianas como mastigar, engolir, fala, sorrir, etc que são a essência da nossa humanidade. A importância dessas estruturas está realçada nos reflexos integradores das suas funções bem como a extensa área representada no córtex cerebral somatossensorial ou motor. Outra característica da dor orofacial é que as vias nervosas que participam da veiculação desse tipo de sensibilidade fazem parte do complexo sistema trigeminal. Esse complexo produz uma vasta convergência de informações de áreas bem distintas da cabeça, o que já é reconhecido por causar o fenômeno da dor referida. As dores orofaciais são de diversos tipos, mas podem ser classificadas como de origem dental ou de origem não dental. As disfunções temporomandibulares incluem um número de problemas clínicos que envolvem tanto a musculatura mastigatória como a ATM propriamente dita (OKESON, 1996).

A ATM é uma articulação complexa e é única em muitos aspectos, mas está sujeita aos mesmos distúrbios das outras articulações sinoviais. A sua disfunção é caracterizada por induzir e manter uma condição inflamatória de artrite, assim como ocorre em qualquer outra articulação (SESSLE, 2003). As dores provenientes da lesão ou disfunção das estruturas da ATM são a principal causa de dor de origem não dental na região orofacial (LIPTON *et al.*, 1993).

Existem muitos modelos experimentais descritos para o estudo das algias provenientes dessa articulação, entretanto nenhum mimetiza de forma completa o processo de disfunção temporomandibular, visto que é multifatorial. Entretanto a inflamação da ATM causa dor e o processo nociceptivo gerado pela inflamação de suas estruturas pode mimetizar alguns aspectos importantes da dor orofacial ligada as DTMs. O modelo escolhido na presente investigação fornece os diversos aspectos ligados à inflamação e dor da ATM, entretanto, assim como os outros modelos, não mimetiza por completo a condição vista na clínica. Mesmo assim nos permite estudar a via trigeminal

na transmissão do processo nociceptivo na região orofacial, que na verdade é o intuito do trabalho.

Em nosso estudo utilizamos um modelo de inflamação da ATM induzida pela injeção de carragenina (DENADAI-SOUZA *et al.*, 2009). A carragenina é um agente flogístico utilizado em diversos modelos clássicos de inflamação. Trata-se de um extrato solúvel em água derivada da carragenina, musgo irlandês, uma alga marinha encontrada nas costas do Atlântico da Europa e na América do Norte, muito utilizada para induzir a reação inflamatória aguda em animais experimentais (GARCIA *et al.*, 1993), ocasionando alteração vascular que desencadeia o acúmulo de líquido e leucócitos nos tecidos extravasculares e na produção de diversos mediadores ligados ao processo inflamatório (SPILLER, 2003). Tem reconhecida atividade hiperalgésica e de produção de diversos mediadores da inflamação e da dor. Já foi demonstrado por diversos autores que carragenina, quando injetada na pata ou na articulação do joelho de ratos, induz a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF, IL-1, IL-6, IL-8), prostaglandinas, leucotrienos, bradicinina, aminas simpatomiméticas, óxido nítrico, histamina, serotonina (TONUSSI & FERREIRA, 1992, 1997, 1999) . No joelho de ratos, seus efeitos nociceptivos são inibidos por analgésicos periféricos e antiinflamatórios como a indometacina, diclofenaco, dipirona e analgésicos centrais como a morfina, assim como também por drogas que interfiram na síntese dos mediadores supracitados como glicocorticóides, talidomida, antagonistas do receptor da bradicinina (TONUSSI & FERREIRA, 1992, 1997, 1999).

Pudemos observar, em nosso modelo de inflamação da ATM pela carragenina que uma única injeção intra-articular desse agente provoca resposta hipernociceptiva com característica persistente. A hipernocicepção induzida por carragenina na região da ATM, em nosso estudo, foi duradoura e se prolongou até o sexto dia (144 horas após a injeção). Após este ponto o limiar de retirada da cabeça foi quase igual ao limiar basal (antes da injeção de carragenina). A hipernocicepção causada no animal era comparada com o animal controle, e era realizado através da medição do limiar de força de pressão na ATM inflamada, até que o animal mostrasse algum sinal de incomodo, como flinch, retirada da cabeça ou sinal sonoro. No entanto para padronizar as medições decidimos escolher a retirada da cabeça como sinal de incômodo que representasse reação a hipernocicepção.

No estudo de Denadai-Souza *et al.* (2009) foi observado o efeito da carragenina no desenvolvimento do processo de artrite da ATM. Esse autor demonstrou que a carragenina induz uma resposta hipernociceptiva duradoura, avaliada pelo parâmetro do limiar de retirada da cabeça, que foi diminuída em relação ao grupo controle. Esse aspecto comportamental durou mais de 168 horas. Além disso, esse efeito hipernociceptivo foi acompanhado por um processo inflamatório incluindo exsudato plasmático, aumento da atividade da mieloperoxidase e da concentração do TNF- α , bem como o recrutamento de leucócitos. A artrite da ATM por carragenina leva a uma condição inflamatória longa e progressiva.

É interessante comparar a hipernocicepção induzida por carragenina na ATM com a hipernocicepção produzida no joelho de ratos. Apesar de serem produzidos os mesmos tipos de mediadores hiperalgésicos há uma clara diferença na cinética de hipernocicepção. No modelo de incapacitação articular do joelho o pico nociceptivo acontece na 3ª e 4ª hora caindo para os níveis basais após a 6ª hora (TONUSSI & FERREIRA, 1992). Como vemos, o processo é mais demorado na ATM tanto no que diz respeito ao pico quanto ao retorno ao nível basal.

Na clínica a articulação temporomandibular é uma estrutura de particular interesse devido a sua ligação com outras estruturas que são essenciais para hemostasia, por exemplo, a inflamação da ATM pode desencadear a atividade de músculos da mastigação, acompanhado por exames eletromiográficos (FRICTON, 2003). Esse fato demonstra que a nocicepção gerada na ATM, além do processo doloroso, pode desencadear um reflexo de contração dos músculos da própria articulação, o que pode levar a um desgaste das estruturas da articulação, dos dentes e provocar cefaléias secundárias. A complexidade dessa articulação, bem como a inervação por um sistema diferenciado pode ser a explicação para as diferenças entre a artrite do joelho e da ATM.

Pacientes que apresentam um quadro de dor funcional na articulação temporomandibular (ATM) geralmente apresentam essa condição acompanhada de um edema na região articular, e normalmente reportam que a área ao redor do edema também se apresenta sensível ao toque. A palpação suave sobre a pele frequentemente revela uma resposta dolorosa do paciente (hiperalgesia e alodinia), sendo que essa

sensibilidade é em parte devido a uma ação periférica dos mediadores do processo inflamatório, os quais são liberados no local da injúria. Em estados de dor crônica, a sensibilidade central torna-se um fator de maior relevância, caracterizando uma disfunção temporomandibular típica (OKESON, 2006).

Os clínicos suspeitam que, com o passar do tempo, as DTMs inflamatórias dolorosas tornam-se muito refratárias ao tratamento, indicando uma cronificação do processo nociceptivo. Isso pode ser devido à ativação do receptor NMDA e à sua ação excitotóxica (TOREBJORK *et al.*, 1992). O processo inflamatório que se instala nessa articulação parece ser mediado por um mecanismo neurogênico, via a liberação de neuropeptídeos (como a substância P), principalmente neurocininas e o fator relacionado com o gene da calcitonina (ALEY & LEVINE, 2002). Esses neuropeptídeos são expressos no gânglio trigeminal (WIDENFALK & WIBERG, 1990), e são transportados de forma anterógrada através das fibras que inervam a ATM tanto em ratos (KIDO *et al.*, 1993; UDDMAN *et al.*, 1998) como em humanos (HAEUCHI *et al.*, 1999). Este processo pode se relacionar com a cronicidade e com respostas terapêuticas recalcitrantes (DUBNER *et al.*, 2004). Esse processo químico envolvido na produção da sensibilização periférica inclui, não apenas os produtos químicos diretamente relacionados à lesão tecidual, mas também a liberação de neurotransmissores pelas próprias terminações dos aferentes periféricos. Isso explica a alta responsividade aos estímulos mecânicos no local da lesão, a sensibilização periférica ou hiperalgesia primária e a subsequente sensibilização de neurônios centrais no processamento da nocicepção gerada periféricamente (DUBNER, 1997; SESSLE, 2003). Esses fatores levam a uma perda da distinção entre informação nociceptiva de alta frequência e mecanoestimulação de baixa frequência (SATO *et al.*, 2005).

Outros modelos de artrite da articulação temporomandibular também são propostos na literatura utilizando várias substâncias álgicas diferentes, como, por exemplo, o Zymosan (CHAVES *et al.*, 2011), o qual possui a capacidade de aumentar a migração de leucócitos, extravasamento celular, ativação da expressão de óxido nítrico, acúmulo de neutrófilos e hipernocicepção mecânica, no entanto essa hipernocicepção é aguda, sendo debelada em torno de 24 a 48 horas.

Na tentativa de validar o modelo proposto por Denadai-Souza *et al* (2009) nos propusemos a avaliar o influxo celular para a cavidade celular. Esse parâmetro foi usado como uma forma de verificar a eficácia da injeção e da carragenina utilizada. Através da análise da contagem celular no líquido articular, nosso estudo demonstrou haver um aumento significativo no influxo celular para a cavidade articular, comprovando o processo inflamatório através desse sinal clássico de inflamação. O aumento na 6^a e na 12^a hora, coincide, com o pico de hipernocicepção observado na avaliação comportamental, estando esse resultado de acordo com resultados de Denadai-Souza *et al* (2009).

O modelo com carragenina é amplamente utilizado para modelos de avaliação de processos nociceptivos devido manter um processo inflamatório prolongado mantendo altos níveis de extravasamento celular após uma única injeção (DENADAI-SOUZA *et al.*, 2009), além de provocar também um aumento na concentração de TNF α e IL-1 β no líquido sinovial e um aumento na atividade de mieloperoxidase, tendo um pico nos níveis desses mediadores em torno de 6 a 24 horas, coincidindo com o pico de hipernocicepção (DENADAI-SOUZA *et al.*, 2009).

Esses achados indicam que os aferentes primários são de fundamental importância no processo nociceptivo gerado pela carragenina, haja vista os resultados obtidos a partir dos dados comportamentais, que indicam uma sensibilidade periférica à pressão na região inflamada pela carragenina, sendo esses aferentes suficientes para a indução da hiperatividade neuronal que pode causar uma supra-regulação de mediadores como a substância P, o CGRP e a IL-1 β a nível central, assim como a fosforilação do receptor NMDA (WANG *et al.*, 2010), levando um quadro de sensibilização central.

A sensibilização central tem um papel crucial na patogênese de condições dolorosas crônicas, como é o caso das disfunções temporomandibulares inflamatórias, tendo esse assunto recebido grande atenção nos últimos anos (CODERRE *et al.*, 1993; DUBNER, 1997), levando-se em conta o papel dos receptores NMDA. Para uma melhor compreensão do papel desses receptores e do magnésio no processamento central da hipernocicepção de artrite da ATM pela via trigeminal, examinamos o papel desses receptores no subnúcleo caudal e a sua ativação pelo glutamato.

Foi necessário um estudo piloto inicialmente para se determinar a dose do antagonista específico do receptor NMDA, MK-801, que, de forma mais eficaz, demonstrasse um efeito inibitório da hipernocicepção gerada pela carragenina i.art., e para isso utilizamos as doses de 0,1 mg/kg, 0,25 mg/kg e 0,5 mg/kg. A melhor dose encontrada, ou seja, a que melhor inibiu o processo nociceptivo foi a dose de 0,5 mg/kg.

Essa dose foi administrada na forma de pré-tratamento, antes da injeção de carragenina, com o intuito de estabelecer um bloqueio “total” desses receptores, para que assim pudéssemos estabelecer o grau de influência que eles possuem na hipernocicepção mediada pela via trigeminal na região Sp5c. E esse procedimento nos mostrou que esses receptores, quando bloqueados, reduzem em até 100% a hipernocicepção gerada pela carragenina na ATM, aumentando, inclusive, o limiar de retirada da cabeça medido antes de começar a indução da artrite.

Esse bloqueio do receptor NMDA pelo antagonista, MK-801, foi dose-dependente e essa inibição da hipernocicepção apresentou um efeito de longa duração, que tendo sido detectada até 120 horas após uma única injeção. Similar aos nossos resultados, outros estudos investigaram um tratamento preventivo com MK-801 (0,5, 0,6 ou 1 mg / kg / dia, i.p.) (DAVAR *et al.*, 1991; BEGON *et al.*, 2000). Nestes estudos o MK-801 reduziu a hiperálgia mecânica e térmica em modelos de dor neuropática mais rapidamente e com maior magnitude quando comparado aos resultados obtidos em nossos experimentos. Embora, nessas doses, o MK-801, muitas vezes possa induzir comportamentos estereotipados (movimentos bruscos, perda de equilíbrio, perda de coordenação dos movimentos e ataxia) nós não observamos esses efeitos em nossos experimentos (dados não mostrados). Esse tipo de comportamento estereotipado também não foi observado por Begon *et al.* (2001) e Chiang *et al.* (1997) os quais utilizaram doses como 0,5 e 1 mg/kg.

Com esses experimentos sugerimos a participação do receptor NMDA na hipernocicepção gerada pela via trigeminal, haja vista, os dados comportamentais da hipernocicepção que obtivemos com o bloqueio do MK-801 nesses receptores. O bloqueio dos receptores NMDA através de uma única injeção do seu antagonista é capaz de inibir a hipernocicepção do começo ao fim. Muito provavelmente a inibição

das primeiras horas de hipernocicepção, incluindo o pico, deva-se a atividade de bloqueio do receptor. Entretanto como o processo nociceptivo da carragenina na ATM dura bem mais do que 6 horas, sugerimos que o bloqueio das primeiras horas é responsável também pela não continuidade do processo nociceptivo, visto que os animais tratados com MK-801 (na melhor dose) não desenvolvem o fenômeno hipernociceptivo a partir da 6ª hora. É interessante notar que na 4ª hora o antagonista ainda não demonstra efeito, somente a partir de 6ª hora o efeito aparece. Isso sugere que os receptores NMDA devem ser mais participativos no horário de pico e nas horas subsequentes. Nas fases iniciais outros receptores devem ser mais importantes. O efeito do antagonista também nos leva a pensar em outros moduladores que interferem no funcionamento do receptor NMDA, bloqueando ou modulando a passagem de cálcio através desse receptor, poderia prover um efeito inibitório satisfatório sobre a hipernocicepção mediada pela via trigeminal.

Em relação ao glutamato, os receptores NMDA e a DTM, tem sido observado que os portadores de DTM e cefaléias, relacionada a DTM, possuem elevados níveis plasmáticos de glutamato e aspartato durante as crises (ALTURA e ALTURA, 2001; JAEGER, 2003). Supõe-se que glutamato seja armazenado nos eritrócitos, portanto deve haver alguma deficiência no mecanismo de recaptura do glutamato nos eritrócitos dos pacientes portadores de enxaqueca relacionado a DTM (FICHER *et al.*, 2000). A relação entre os níveis plasmáticos elevados de glutamato e a ativação do receptor NMDA, no SNC quando as fibras C são ativadas devido a uma DTM, possivelmente se dá devido aos disparos consecutivos gerados pelo processo inflamatório artrítico. Isso gera uma maior liberação de glutamato e uma maior sensibilização na população de receptores NMDA, ocasionando um processo de hiperalgesia (SESSLE, 2003; DUBNER, 2004).

Entendendo que o magnésio é um modulador fisiológico do receptor NMDA, possuindo um papel importante no bloqueio da abertura do canal pelo glutamato, nós investigamos o efeito da suplementação de magnésio e da deficiência de magnésio no processo de hipernocicepção da via trigeminal.

Em nosso estudo observamos o efeito da suplementação com $MgCl_2$, sendo essa substância capaz de reduzir significativamente o comportamento hipernociceptivo

relacionado com artrite da ATM. A escolha desse sal de magnésio é justificada pela sua via de administração ser mais segura e ter maior grau de absorção, segundo a literatura, dentre os outros sais de magnésio administrados via oral (SPASOV *et al.*, 2010; FIROZ & GRABER, 2001; WHITE *et al.*, 1992), além de ser também uma substância já comercialmente utilizada para tratamento de reposição mineral.

Testamos três doses de $MgCl_2$ via oral a de 10 mg/kg, 30 mg/kg e 90 mg/kg como pré-tratamento 3 dias anteriores à injeção de carragenina, e descobrimos que a dose de 90 mg/kg apresentou o melhor efeito inibitório no comportamento hipernociceptivo, após esses 3 dias. Por essa razão, nós utilizamos essa dose nos experimentos seguintes, investigando o efeito dessa dose após 5 e 7 dias de pré-tratamento com a suplementação de $MgCl_2$.

Os resultados obtidos em nosso estudo mostram, pela primeira vez, que a administração repetida de $MgCl_2$ é capaz de reverter parcialmente o quadro de hipernocicepção gerado pela carragenina alterando o limiar de retirada da cabeça no modelo animal de artrite da ATM. Esse fato é consistente com outros estudos os quais mostraram que a suplementação de sais de magnésio é capaz de reverter quadros de hipernocicepção animal (BEGON *et al.*, 2000). Observou-se que o melhor protocolo experimental de administração de cloreto de magnésio foi um pré-tratamento de sete dias antes da injeção de carragenina. Nesse protocolo, usando a dose de 90 mg/kg, observamos que essa dose foi a que inibiu de forma mais eficaz a hipernocicepção, chegando também a atingir a maior concentração plasmática, após esse período de 7 dias, sem, no entanto, apresentar efeitos adversos.

Alguns autores reportaram haver uma direta relação entre os níveis de magnésio plasmático e doenças neurodegenerativas, havendo uma relação inversa entre elas, ou seja, baixos níveis de íons magnésio pareciam estar associados a doenças como Alzheimer e convulsões (VINK *et al.*, 2009).

Estudos de Crosby *et al.* (2000) mostraram que a concentração de magnésio no soro chega a 1 mmol/l, após a administração endovenosa de 500 mg de cloreto de magnésio no tratamento da dor neuropática em pacientes com câncer. Além disso, eles mostraram que esta concentração não apresentava efeitos colaterais (como diarreia,

desorientação, descoordenação motora, dificuldade de respirar, paralisia muscular e irritação). Considerando que não há diretrizes rígidas na escolha ideal da dose de magnésio, tentamos evitar efeitos tóxicos do magnésio, tendo o cuidado de não deixar o nível plasmático de magnésio ser superior a 3 mmol/l (FELSBY *et al.*, 1995). Em nossos experimentos, no sétimo dia após o começo da suplementação, o nível de magnésio plasmático se apresentou em cerca de 1,1 mmol/l no plasma sanguíneo, sendo essa taxa ainda abaixo dos níveis tóxicos.

Da mesma forma Begon *et al.* (2000) mostraram o efeito de 5 dias de tratamento com suplementação de sulfato de magnésio, demonstrando que a administração de sulfato de magnésio reverteu significativamente a hiperalgesia mecânica na neuropatia em ratos diabéticos com a mesma eficácia do antagonista do receptor NMDA, o MK-801. No experimento com o modelo de neuropatia por lesão nervosa, o mesmo autor relatou que esse mesmo sal, o sulfato de magnésio, no primeiro dia de tratamento, já foi capaz de reduzir a hiperalgesia de forma significativa em ratos neuropáticos.

A suplementação oral com $MgCl_2$ mostrou um efeito potencialmente protetor contra a hipernocicepção, provavelmente interferindo no processamento central da hipernocicepção, nos receptores NMDA, reduzindo o comportamento hipernociceptivo causado pela carragenina na ATM de ratos, como mostram nossos resultados. Nós não fizemos experimentos que pudessem comprovar o nível central de alcance da suplementação oral, pois isso teria que ser determinado através da dosagem no liquor. Entretanto a literatura cita que magnésio alcança o sistema nervoso central. Hallack *et al.* (1994) encontrou uma significativa concentração de magnésio no líquido cefalorraquidiano e na medula espinhal após a administração de sulfato de magnésio intraperitoneal, e alimentação enriquecida com magnésio, mostrando que o magnésio é capaz de atravessar a barreira hemato-encefálica, podendo então chegar aos receptores NMDA a nível central.

A literatura mostra vários estudos com os efeitos analgésicos da suplementação do magnésio, mostrando que esse é capaz de provocar uma melhora em quadro de dores ou hiperalgesia de várias origens como: cefaléias (ALTURA & ALTURA., 2001), dor provinda de cânceres (CROSBY *et al.*, 2000) e dores neuropáticas (BRILL *et al.*, 2002) além de demonstrar também que a deficiência do magnésio no organismo pode levar a

várias consequências como respostas mais aguçadas a estímulos nocivos e à inflamação (MAZUR *et al.*, 2007).

Existem, atualmente antagonistas não seletivos dos receptores NMDA disponíveis para uso clínico. No entanto, vários compostos aprovados para uso em seres humanos, mas tendo indicações de uso em outras enfermidade, possuem significativas propriedades bloqueadoras do receptor NMDA. Dentre essas podemos citar a quetamina, o MK-801 e o magnésio, sendo esses os de maior interesse atualmente. Infelizmente, os benefícios de substâncias como a quetamina e o MK-801 podem ser limitadas devido à grande quantidade de efeitos colaterais, pois ambos os compostos afetam a sinalização do receptor NMDA em outras funções, além da nocicepção (LODGE & JONHSON., 1990; LO *et al.*, 1998; KOVACIC *et al.*, 2010). O Ifenprodil é uma droga antagonista de receptores NMDA que bloqueia seletivamente a subunidade NR2B, mas ainda é pouco estudado do ponto de vista clínico, sendo utilizada basicamente no tratamento da claudicação intermitente. Logo temos a hipótese de que o uso racional do magnésio em doses controladas pode ser clinicamente útil e com bem menos efeitos colaterais. Em um estudo clínico inicial, Liu *et al.* (2001) demonstrou que os dois compostos, magnésio e quetamina, combinados de fato potencializam um ao outro e que a administração de ambas reduzem o consumo de morfina pós-operatória mais do que cada composto utilizado individualmente.

Com tudo isso, podemos sugerir que o magnésio possui um papel central importante na modulação da ativação dos receptores NMDA e, conseqüentemente, no processo hipernociceptivo. Esses resultados também demonstram que a falta de magnésio poderia facilitar o processo de sensibilização das vias nociceptivas no subnúcleo caudal envolvendo uma maiores ativação dos receptores NMDA, levando a uma diminuição do limiar de nocicepção.

Outro elemento a ser considerado seria o decréscimo nos níveis de magnésio. A literatura reporta que os íons de magnésio normalmente bloqueiam os canais de cálcio nos receptores NMDA (SUTOR *et al.*, 1987), não permitindo o influxo de cálcio pelo canal desse receptor. O Magnésio tem uma reconhecida atividade antagônica ao cálcio na liberação de neurotransmissores (DEL CASTILLO & STARK, 1952; DEL CASTILLO & ENGBAEK, 1954; HUTTER & KOSTIAL, 1954). A ocorrência de

decréscimo nos níveis de magnésio disponível no meio extracelular permite maior influxo de cálcio e a despolarização dos neurônios, provavelmente com uma maior liberação de glutamato. Tem sido também observado que existe um decréscimo no nível de magnésio entre os ataques de enxaqueca, o qual pode tender a aumentar a autorregulação dos receptores NMDA. Alguns estudos observaram uma melhora no quadro de cefaléias relacionadas com a suplementação de magnésio (ALTURA & ALTURA, 2001).

Para determinar o efeito da deficiência de magnésio observamos o desenvolvimento de uma hipernocicepção mecânica, medida pelo limiar de retirada da cabeça no grupo com deficiência de magnésio com artrite induzida pela injeção de carragenina, e comparamos com o grupo que recebeu dieta normal e mesma injeção de carragenina. Pudemos demonstrar que a deficiência de magnésio foi capaz de induzir um estado de hiperalgesia, pois o limiar nociceptivo do grupo com dieta livre de magnésio permaneceu inferior ao do grupo com dieta normal ao longo de todas as 120 horas do experimento. Na verdade, consistente com outros estudos experimentais (DUBRAY *et al.*, 1997; ALLOUI *et al.*, 2003), observamos, em nosso modelo, que a deficiência de magnésio promove um efeito hipernociceptivo e que o MK-801 apresenta um efeito protetor sobre este processo hipernociceptivo capaz de reverter de forma eficaz a hipernocicepção associada a deficiência de magnésio, da mesma forma como mostrado em outros estudos (DAVAR *et al.*, 1991).

Além disso, o grupo com dieta livre de magnésio, que não recebeu carragenina apresentou um limiar mais baixo, quando comparado com seu limiar basal, considerando limiar basal o tempo antes da administração da dieta livre de magnésio. Deve-se também considerar o fato que a deficiência de magnésio pode alterar as subpopulações de leucócitos e levar ao aumento de interleucina-6, exacerbando o processo inflamatório gerado pela artrite da ATM, por si só (DAE *et al.*, 2010), mostrando o potencial nocivo da falta desta substância no organismo.

Estudo anterior demonstrou que a deficiência de magnésio induz uma sensibilização das vias nociceptivas da medula espinhal, envolvendo receptores NMDA e não NMDA nesse processo (BEGON *et al.*, 2001). Outro autor mostrou que a suplementação de magnésio diminuiu o efeito de aminoácidos excitatórios no sistema

nervoso central, sugerindo que a dor contínua e comportamentos hipernociceptivos são fenômenos interligados mediados por esse mesmo receptor (FERIA *et al.*, 1993).

Em alguns trabalhos experimentais (ALLOUI *et al.*, 2003; BEGON *et al.*, 2001) a hipomagnesemia foi definida como um nível de magnésio no soro inferior a 1,8 mg / dL ($<0,74$ mmol / L). Em nossos experimentos, a hipomagnesemia foi induzida pela ingestão inadequada de magnésio através da administração de dieta especial livre de magnésio e água deionizada. Alloui *et al.* (2003), após 10 dias da administração de dieta livre de magnésio, induziu hiperálgia mecânica e Begon *et al.* (2001) mostrou os mesmos resultados após 9 dias da mesma dieta. Da mesma forma, obtivemos uma hipomagnesemia induzida por um período de 9 dias de administração de uma dieta livre de magnésio, e medimos os níveis plasmáticos de magnésio, que mostraram uma diferença significativa em relação aos níveis basais (antes da dieta alimentar livre de magnésio). A resposta comportamental que obtivemos, diminuição do limiar de retirada da cabeça, foi condizente com o quadro de indução de deficiência de magnésio investigada antes e após a indução da artrite com carragenina.

Com os nossos resultados conseguimos determinar que há um relação direta entre os níveis plasmáticos de magnésio e a intensidade da nocicepção induzida por carragenina, existindo a possibilidade do magnésio modular a ativação do receptor NMDA. Então decidimos investigar se esses fatores poderiam alterar a expressão relativa das subunidades do receptor NMDA e na fosforilação da subunidade NR1, o que é fundamental para formação desse receptor, na região Sp5c da medula espinhal, a qual recebe as informações dos estímulos nociceptivos da ATM. Então, nós observamos através de uma análise de RT-PCR, a expressão relativa de subunidades dos receptores NMDA, e através da análise de imunohistoquímica, a fosforilação da subunidade NR1, em seguida tentamos relacionar com os resultados comportamentais da hipernocicepção causada pela carragenina na ATM.

A análise imunohistoquímica do tecido retirado da região do subnúcleo caudal trigeminal (Sp5c) sugeriu que houve um aumento da subunidade NR1 fosforilada nessa região em animais com artrite induzida pela carragenina, quando comparada com os animais naive, e o tratamento com a suplementação de $MgCl_2$ revelou uma possibilidade de diminuição da imuno-marcação no grupo de animais com artrite não

tratados com a suplementação com $MgCl_2$. Esses resultados estão diretamente relacionados com os resultados obtidos nos testes comportamentais, os quais mostraram que a suplementação diminuiu o comportamento nociceptivo e a carragenina aumentou essa resposta. Também pudemos sugerir que a deficiência de magnésio pode aumentar a fosforilação da subunidade NR1, esse fato está diretamente relacionado com a diminuição do limiar nociceptivo no grupo de animais não injetados com carragenina e no grupo de animais injetados com carragenina.

A partir desses fatos podemos sugerir, que a fosforilação dessa subunidade NR1, poderia ter um relação direta com o processo nociceptivo na via trigeminal e que a suplementação com magnésio foi capaz de diminuir essa fosforilação.

A fosforilação de proteínas do receptor NMDA tem sido reconhecida como o principal mecanismo de regulação do funcionamento desse receptor na via trigeminal, mostrando também que sua ativação pode ser regulada por vários mediadores inflamatórios como as proteínas quinases e fosfatases (TINGLEY *et al.*, 1997). Assim, podemos presumir que essa fosforilação da subunidade NR1 é um dos eventos que ocorre em resposta à estimulação da via nociceptiva, a qual, por sua vez, reforça a sensibilização nociceptiva central (CHIANG *et al.*, 1997).

Alguns trabalhos mostram a relação direta entre hipernocicepção periférica relacionada com a fosforilação das subunidades NR1, tanto no hipotálamo (PENG *et al.*, 2011) como no subnúcleo trigeminal caudal (TAKAHASHI *et al.*, 2011) através de modelos com inflamação. No entanto, em relação ao magnésio, não há evidências atuais na literatura que mostrem a influência desse íon relacionado à expressão ou fosforilação dos diferentes subtipos de receptores NMDA no processo de hipernocicepção na via trigeminal, sendo esse trabalho pioneiro nessa abordagem.

Em relação a expressão de subtipos de receptores NMDA, primeiro observamos os níveis da subunidade NR1. Nós pudemos observar que o nível de NR1 foi aumentado em resposta à injeção de carragenina. Como esperado, observou-se um aumento da regulação da subunidade NR1 no grupo injetado com carragenina com dieta normal, estando esse resultado relacionado com o efeito comportamental de diminuição do limiar de retirada da cabeça, mostrando que a hipernocicepção causada por carragenina

em tecidos orofaciais, especificamente na ATM, poderia ocasionar novos arranjos nas subunidades dos receptores NMDA no subnúcleo caudal do trigêmeo (região Sp5c).

Trabalhos mostram que essa subunidade (NR1) está diretamente relacionada com a facilitação central da transmissão da dor produzida por uma lesão periférica (MIKI *et al.*, 2002). Estudos como o de Wang *et al.* (2010) mostram uma relação direta entre a expressão NR1 na medula espinhal e a presença de mediadores inflamatório como IL-1 β , estando ambos aumentados após a lesão tecidual orofacial, sendo esse estímulo processado pela via trigeminal no subnúcleo caudal. McNearney *et al.* (2000) encontram uma ligação entre a sinalização celular neurogênica e o neurotransmissor glutamato, sendo esse liberado nos terminais nervosos periféricos e tendo células-alvo na cápsula articular da ATM. Nesse experimento, esse autor encontrou uma expressão aumentada da subunidade NR1 nos sinoviócitos.

Alguns estudos mostram a influência e a presença de mediadores inflamatórios como o IL-6 e NF- $\kappa\beta$ na hipernocicepção relacionada a artrite da ATM na região Sp5c do tronco cerebral *ipsilateral* a lesão. Demonstrando, assim, que essa região está envolvida na ativação glial e neuronal da via nociceptiva trigeminal e no comportamento nociceptivo (WANG *et al.*, 2010). Estudos recentes também demonstraram a ativação astrogliar e neuronal dentro da zona do subnúcleo caudal do trigêmeo, após o processo inflamatório, mostrando que esse processo foi capaz de induzir a fosforilação dos receptores NMDA via liberação de IL-1 β (GUO *et al.*, 2007). Estudos como o de Wang *et al.* (2009) sugerem uma possível seqüência de eventos relacionados com a expressão da subunidade NR1 na região Sp5c após inflamação da ATM. Ou seja, a inflamação periférica pode aumentar a expressão de citocinas como IL-6 e IL-1 β dentro do sistema nervoso central por meio da via trigeminal, levando à expressão aumentada de receptores NMDA, mostrando que há diferenças na expressão da NR1 após a inflamação da ATM .

Nossos resultados mostram que a suplementação como MgCl₂ não modificou o aumento de RNAm de NR1 induzida pela carragenina. Mas isso pode ser devido a sua ação estimulatória sobre a produção de NR3, como discutido adiante, haja vista que NR1 é uma subunidade obrigatória. Sem a subunidade NR1 os receptores NMDA não são gerados e assim podemos inferir que o aumento de outras subunidades, como a NR2

e NR3, podem acompanhar o aumento da subunidade NR1. Os animais com deficiência de magnésio também demonstraram um aumento da expressão do NR1 além de sua fosforilação. Entretanto quando animais deficientes de magnésio recebem a injeção de carragenina, surpreendentemente, nossos resultados, apesar do aumento no comportamento hipernociceptivo, houve uma sub-regulação da expressão na subunidade NR1 nesse grupo de animais. Este efeito, possivelmente, poderia representar uma lesão devido a uma excitabilidade neuronal excessiva resultante de um excesso de liberação de glutamato provocado pela carragenina e pela deficiência de magnésio. Entretanto, não foi observado uma diminuição da fosforilação dessa subunidade NR1, sugerindo que houve redução no RNAm que decodifica essa subunidade, mas isso não afetou o nível de proteína fosforilada, pelo menos, no tempo avaliado.

Alguns trabalhos mostram que uma superestimulação dos receptores NMDA induz a um nível anormalmente elevado de glutamato no sistema nervoso, que media um processo excitotóxico, como pode ser observado em muitas doenças neurológicas (BAI & HOFFMAN, 2009). Isto poderia induzir a ativação anormal dos receptores de glutamato, levando à morte celular (KARLSSON *et al.*, 2002). Outros estudos mostram que o receptor NMDA, quando é cronicamente ativado ou está super-expresso, pode conduzir a um processo de excitotoxicidade (KIM *et al.*, 2009). Assim, acreditamos que esta regulação negativa da do RNAm da subunidade NR1 na análise de RT-PCR é resultado de uma resposta fisiológica ao efeito excitotóxico do excesso de glutamato na via nociceptiva, o que poderia levar a morte neuronal, diminuindo a expressão total de RNA mensageiro para essa subunidade e conseqüentemente uma diminuição da produção dos receptores NMDA. Mas para determinar isso, são necessários mais estudos.

Sabe-se relativamente pouco sobre o papel do glutamato e seus receptores nas terminações sensoriais periféricas e menos ainda, nas terminações trigeminais. Existe um amplo corpo de evidência de que os aminoácidos excitatórios são responsáveis pela transmissão da informação sensorial originada na periferia para o sistema nervoso central. Fiorentino *et al.* (1999) mostraram que a injeção de glutamato 250,0 mM na região temporomandibular causou um aumento na nocicepção. Estes dados sugerem que receptores glutamatérgicos, principalmente os NMDAs, estão presentes nas regiões

avaliadas e que o glutamato é capaz de ativá-los e causar nocicepção *per se*. (CAIRNS *et al.*, 2003; BARDONI *et al.*, 2004).

A análise de RT-PCR mostrou também que a subunidade NR2B é sub-regulada pelo tratamento com MgCl₂. Este resultado pode explicar o efeito protetor do bloqueio de magnésio do receptor NMDA. Não sabemos se a diminuição da entrada nociceptiva está levando à baixa regulação da expressão de NR2B ou se a baixa regulação de subunidade NR2B é responsável pela diminuição da nocicepção. Mas podemos sugerir que o bloqueio dos receptores NMDA pelo magnésio, por um lado, é o responsável pelo efeito antinociceptivo comportamental e, por outro lado, possivelmente é o responsável pela baixa regulação dessa subunidade, uma vez que a deficiência de magnésio não mostrou qualquer efeito na expressão NR2B, mas induziu a hipernocicepção.

Estudos sobre receptor NMDA no gânglio trigeminal mostram a presença das subunidades NR1 e NR2 expressos na soma de pequenos e médios neurônios aferentes primários que inervam a ATM (CAIRNS *et al.*, 2003). Também há estudos os quais mostram que a subunidade NR2B foi diretamente implicada na percepção da dor em resposta à lesão tecidual periférica (BOYCE *et al.*, 1999). Outros autores mostraram haver uma superexpressão NR2B no córtex cingulado anterior e no insular exibem uma resposta aumentada a estímulos inflamatórios após a injeção agente irritante na pata posterior de ratos (BOYCE *et al.*, 1999; GUO & HUANG, 2001). Wu *et al.* (2005) sugerem que a supra-regulação, e não a fosforilação, de subunidades NR2B pode estar envolvidas no aumento de correntes mediadas pelo receptor NMDA no córtex cingulado anterior após a inflamação, e que a supraregulação dos receptores NR2B no córtex cingulado anterior pode estar relacionado com comportamentos de sensibilização central.

Gaunitz *et al.* (2002) mostraram, por análise de RT-PCR, uma expressão predominante de RNAm do NR2B, e uma expressão menor, mas distintas de cada uma das outras subunidades NR2 após a indução de neuropatia periférica no corno dorsal. Análise de western blot e PCR apresentaram um aumento nos níveis de RNAm e proteína NR2B, indicando o envolvimento direto de NR2B na alodinia mecânica que está associada à neuropatia dolorosa a oxaliplatina (MIHARA *et al.*, 2011) e também em outros modelos de dor neuropática (ZHANG *et al.*, 2009). Essa subunidade parece

ser menos sensível ao bloqueio de magnésio durante a potenciação da PKC que ocorre durante a hiperalgesia inflamatória (GUO & HUANG, 2001). Também outros autores mostram que a expressão de RNAm das subunidades NR1, NR2A e NR2B começam a ser expressadas cerca de 5 horas após processo inflamatório, originado por administração de CFA na pata traseira de ratos, embora apenas a subunidade NR2B tenha uma diferença estatística significativa neste período de tempo. Esse mesmo estudo também demonstrou que após 7 dias, seguido do estímulo nociceptivo, todas as 3 subunidades já apresentavam suas expressões significativamente maiores e iguais entre si (MIKI *et al.*, 2001).

No que diz respeito à subunidade NR3 observamos que a depleção de magnésio aumentou a expressão de RNAm para a subunidade NR3. Além disso, houve uma grande supra-regulação dessa subunidade, quando os animais foram suplementados com MgCl₂.

Após uma incessante pesquisa na literatura não conseguimos encontrar outro trabalho que mostrasse uma análise ou resultados semelhante aos encontrados pela nossa pesquisa, este é o primeiro trabalho em que isso é demonstrado. Além disso não há nenhum estudo relativo a subunidade NR3 relacionado com hipernocicepção e deficiência ou suplementação de magnésio. A literatura mostra que os receptores NMDA formados com esta subunidade são insensíveis ao bloqueio pelo magnésio e que a célula neuronal e a glial também expressam esse tipo de receptores em resposta à lesão periférica (VERKHRATSKY & KIRCHHOFF, 2007). Além disso, quando co-expressas as subunidades NR1 e NR2 com as subunidades NR3, forma um complexo que parece modular a atividade do receptor NMDA, de forma a diminuir a permeabilidade e a condutância do receptor para o cálcio, além de diminuir a sensibilidade do receptor para a ligação do magnésio dentro do canal (PETRENKO *et al.*, 2000).

Estudos de longas datas já demonstravam o efeito opositor entre o magnésio e o cálcio nas terminações nervosas pré-juncionais. Esses trabalhos mostravam que as células neuronais liberam seus neurotransmissores de acordo com a concentração de cálcio na membrana, ou seja, quanto maior a concentração de cálcio na membrana pré-sináptica maior é a liberação de neurotransmissores. Em contrapartida a liberação de

neurotransmissores fica inibida quando há um aumento nos níveis de magnésio na membrana pré-sináptica (DEL CASTILLO & STARK, 1952; DEL CASTILLO & ENGBAEK, 1954; HUTTER & KOSTIAL, 1954).

O efeito anti-hipernociceptivo do magnésio pode, também ser explicado por esse mecanismo, ou seja, quando há uma maior concentração de íons magnésio na membrana pré-sináptica, ocorre um efeito opositor do magnésio em relação ao cálcio, havendo uma ação inibitória sobre a liberação de glutamato no terminal pré-sináptico de neurônios glutamatérgicos. No entanto experimentos direcionados para estudos eletrofisiológicos em células do corno dorsal ou na região Sp5c seriam necessários para confirmar essa hipótese.

Levando em consideração esse efeito do magnésio na liberação do glutamato, nós sugerimos que a deficiência de magnésio induzida por uma dieta livre de magnésio, provoca uma supra-regulação da expressão da subunidade NR3 possivelmente através de um mecanismo compensatório fisiológico no neurônio pós-sináptico em resposta a ao aumento do glutamato. A diminuição no nível de magnésio sistêmico pode levar a um aumento da corrente de cálcio para dentro das células neuronais na membrana pré-sináptica, aumentando a liberação de glutamato e, conseqüentemente, intensificando a possibilidade de um efeito neurotóxico devido ao excesso desse neurotransmissor, adicionado ao fato de haver uma diminuição no bloqueio dos receptores NMDA (no terminal pós-sináptico) pelo próprio magnésio. Um mecanismo compensatório pode, então, aumentar os níveis de expressão de RNAm para a subunidade NR3 supostamente contida nesses receptores, que, por sua vez, tem um efeito inibitório na ação de indução de correntes originadas pelo glutamato no receptor NMDA, haja vista que esse tipo de subunidade forma um complexo, juntamente com a subunidade NR1, insensível a ligação do glutamato, além de exibir uma diminuição na probabilidade de abertura do canal e um maior tempo de abertura desses canais, evitando o aumento de passagem de correntes no receptor. Essa observação está de acordo com o estudo de DAS *et al.* (1998) que demonstrou que ratos com falta de subunidade NR3 apresentavam um aumento na passagem de correntes pelo receptor NMDA.

Pelos resultados que obtivemos também especulamos que possa haver um possível efeito neuroprotetor da subunidade NR3 nos animais que receberam

carragenina, sendo depletados ou não de magnésio. Os gráficos mostram que há um aumento significativo dessas subunidades nesses grupos em relação ao grupo *naive*. Esse fato demonstra uma possível adaptação do organismo frente aos estímulos nociceptivos, tentando preservar a integridade celular da super liberação de glutamato no meio, o qual pode levar a um neurotoxicidade e morte celular, como mencionado anteriormente. Esse efeito neuroprotetor já havia sido encontrado em outros estudos, indicando ser essa subunidade um possível alvo terapêutico (NAKANISH *et al.*, 2009).

Em síntese em relação a subunidade NR3, nosso trabalho mostrou que a suplementação de magnésio aumenta a expressão de subunidade NR3, e esse fato é intrigante mas pode ser explicado. Sugerimos que o bloqueio pelo magnésio nos receptores NMDA pode induzir um mecanismo compensatório o qual faz com que a célula neuronal expresse mais o dieteromero NR1/NR3, o qual é totalmente insensível ao bloqueio do magnésio, a fim de manter o balanço ou o tônus eletrofisiológico da célula neuronal. Em adição o antagonismo ao cálcio no terminal pré-sináptico promove uma diminuição da liberação de glutamato o que pode levar a uma compensação fisiológica no sentido da produção de um receptor que não dependa de glutamato como é o NR1/NR3 que tem a glicina como agonista estimulatório. Nos também podemos sugerir que possivelmente a diminuição da expressão de RNAm para subunidade NR2 e o aumento da expressão do RNAm para a subunidade NR3 pode ser resultado direto do efeito antinociceptivo do cloreto de magnésio.

A figura 16 sugere um mecanismo da modulação exercida pela deficiência de magnésio bem como pela sua suplementação. O mecanismo sugere um efeito tanto a nível pré-sináptico baseado nas evidências da literatura sobre o seu antagonismo com o cálcio, assim como um efeito sobre o terminal pós-sináptico. No terminal pós-sináptico o efeito seria, tanto em relação à fosforilação do receptor constitutivo, assim como em relação ao RNAm, principalmente as subunidade NR2B e NR3A.

Os dados apresentados no presente estudo puderam contribuir para uma melhor compreensão do processamento nociceptivo central pela via trigeminal e o desenvolvimento de novas abordagens para o tratamento da dor orofacial com origem na ATM.

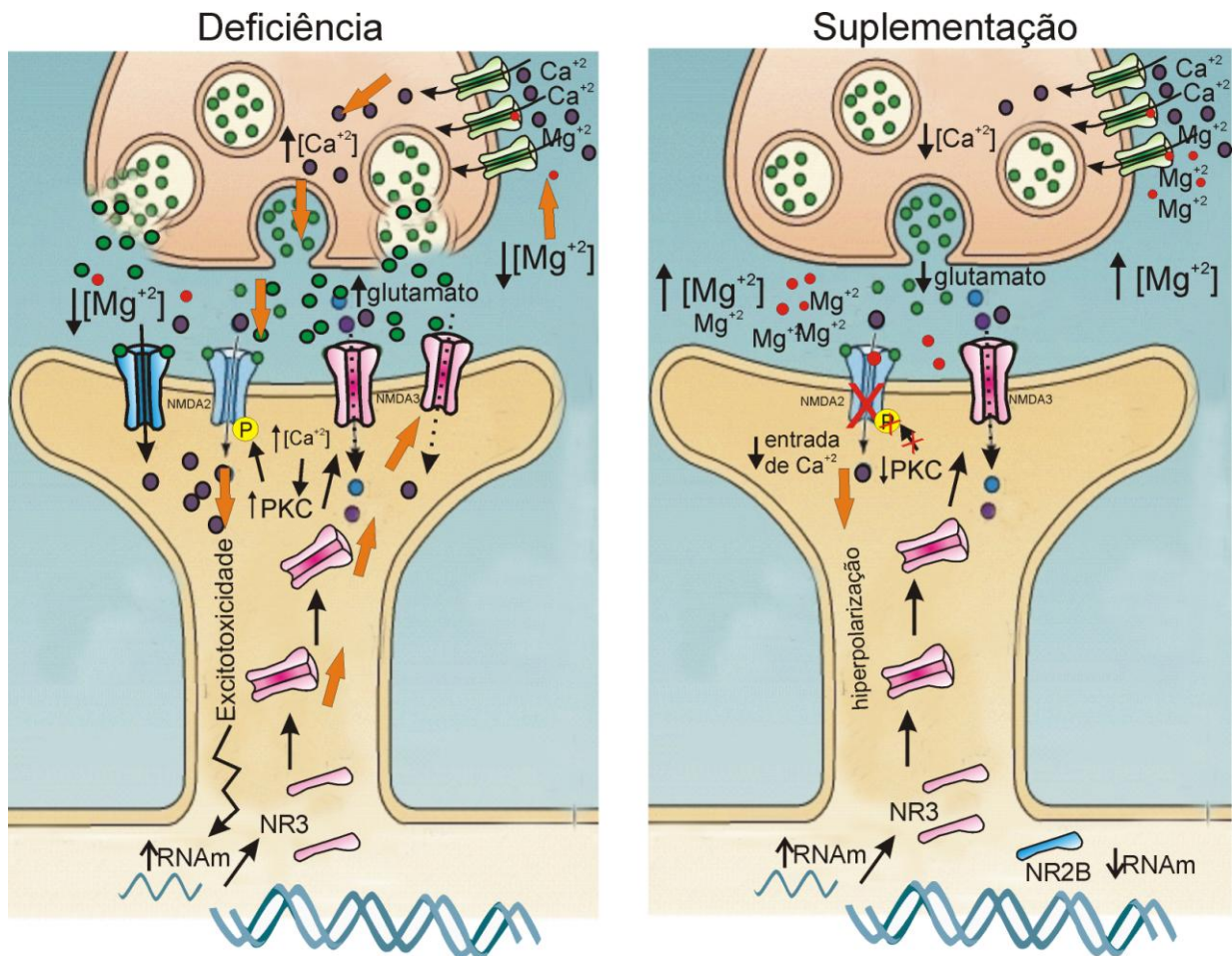


Figura 16. Ilustração hipotética do mecanismo de alteração da expressão das subunidades NR3 e NR2B dos receptores NMDA pela deficiência e suplementação com $MgCl_2$. PKC, proteína quinase C; P, fosfato.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Nossos resultados nos permitem concluir que:

1. Os receptores NMDA têm um importante papel na hipernocicepção inflamatória da ATM e que o magnésio tem uma importante ação anti-hipernociceptiva nessa mesma condição;
2. O nível de magnésio no organismo é importante para a manutenção do limiar nociceptivo, haja vista que a deficiência dele induz um quadro de hiperalgesia;
3. A suplementação, assim como a deficiência, de magnésio pode influenciar a expressão de RNAm para as diversas subunidades do receptor NMDA na região do subnúcleo caudal do complexo sensorial trigeminal (Sp5c);
4. A variação na expressão das subunidades NR3 e NR2B, possivelmente podem explicar o efeito modulador do magnésio no limiar nociceptivo, mas são necessários mais experimentos mais específicos para determinar essas observações.

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

ALEY, K.O.; LEVINE, J.D. Different peripheral mechanisms mediate enhanced nociception in metabolic/toxic and traumatic painful peripheral neuropathies in the rat. **Neuroscience**, v.11, p.389–97, 2002.

ALLENNA, C.E.; WORSLEYA, M.A.; KINGB, A.E.; BOISSONADEA, F.M. Fos expression induced by activation of NMDA and neurokinin-1 receptors in the trigeminal subnucleus caudalis in vitro: Role of protein kinases. **Brain Research**, v.1368, n.23, p.19-27, 2011.

ALLOUI, A.; BEGON, S.; CHASSAING, C.; ESCHALIER, A.; GUEUX, E.; RAYSSIGUIER, Y.; DUBRAY, C. Does Mg²⁺ deficiency induce a long-term sensitization of the central nociceptive pathways? **Eur J Pharmacol.**, v.469, p.65–69, 2003.

ALTURA, B. M.; ALTURA, B. T. Tension headaches and muscle tension: is there a role for magnesium? **Medical Hypotheses**, v.57, n.6, p.705-713, 2001.

APPELGREN, A.; APPELGREN, B.; ERIKSSON, S.; KOPP, S.; LUNDEBERG, T.; NYLANDER, M.; THEODORSSON, E. Neuropeptides in temporomandibular joints with rheumatoid arthritis: a clinical study. **Scand J Dent Res.**, v.99, n.6, p.519-21, 1991.

BAI, G.; HOFFMAN, P.W. Transcriptional Regulation of NMDA Receptor Expression. *Biology of the NMDA Receptor*. Chapter 5. Editor: Boca Raton, Florida. 2009. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5277/>.

BAKOTA, L.; OROJAN, I.; GULYA, K. Intranuclear differences in calmodulin gene expression in the trigeminal nuclei of the rat brain. **Acta Biologica Szegediensis**, v.49, n.4, p.9-14, 2005.

BARDONI, R.; TORSNEY, C.; TONG, C-K.; PRANDINI, M.; MACDERMOTT, A.B. Presynaptic NMDA Receptors Modulate Glutamate Release from Primary Sensory Neurons in Rat Spinal Cord Dorsal Horn. **The Journal of Neuroscience**, v. 24, n.11, p.2774 –2781, 2004.

BATTAGLIA, G.; RUSTIONI, A. Coexistence of glutamate and substance P in dorsal root ganglion neurons of the rat and monkey. **J. Comp. Neurol.**, v.277, n.2, p.302-312, 1988.

BEGON, S.; PICKERING, G.; ESCHALIER, ALAIN.; MAZUR, A.; RAYSSIGUIER, Y.; DUBRAY, C. Role of spinal NMDA receptors, protein kinase C and nitric oxide synthase in the hyperalgesia induced by magnesium deficiency in rats. **British Journal of Pharmacology**, v.134, p.1227-1236, 2001.

BEGON, S.; PICKERING, G.; ESCHALIER, A.; DUBRAY, C. Magnesium and MK-801 have a similar effect in two experimental models of neuropathic pain. **Brain Res.**, v.887, p.436-439, 2000.

BOYCE, S.; WYATT, A.; WEBB, J. K.; O'DONNELL, R.; MASON, G.; RIGBY, M.; SIRINATHSINGHJI, D.; HILL, R. G.; RUPNIAK, N. M. J. Selective NMDA NR2B antagonists induce antinociception without motor dysfunction: correlation with restricted localization of NR2B subunit in dorsal horn. **Neuropharmacology**, v.38, p.611-623, 1999.

BRILL, S.; SEDGWICK, P. M.; HAMANN, W.; DI VADI, P. P.; Efficacy of intravenous magnesium in neuropathic pain. **British Journal of Anaesthesia**, v.89, n. 5, p.711-714, 2002.

BROTON, J.G.; SESSLE, B.J. Reflex excitation of masticatory muscles induced by algescic chemicals applied to the temporomandibular joint of the cat. **Arch Oral Biol.**, v.10, p.741-7, 1988.

CAIRNS, B. E.; SVENSSON, P.; WANG, K.; HUPFELD, S.; GRAVEN-NIELSEN, T.; SESSLE, B. J.; BERDE, C. B.; ARENDT-NIELSEN, L. Activation of Peripheral NMDA Receptors Contributes to Human Pain and Rat Afferent Discharges Evoked by Injection of Glutamate into the Masseter Muscle. **J Neurophysiol.**, v.90, p.2098–2105, 2003.

CAPRA, N. F.; DESSEM, D. Central connections of trigeminal primary afferent neurons: topographical and functional considerations. **Critical reviews in oral biology and medicine**, v. 4, n.1, p.1-52, 1992.

CARLSON, G.E.; LeRESCHÉ, L. Epidemiology of temporomandibular disorders. In: SESSLE, B.J.; BRYANT, O.S.; DINONNE, R. Temporomandibular disorders and related pain conditions. IASP press, Seattle, p.211-226, 1995.

CARLTON, S.M.; COGGESHALL, R.E. Inflammation-induced changes in peripheral glutamate receptor populations. **Brain Res.**,v.820, p.63–70, 1999.

CARLTON, S.M.; HARGETT, G.L.; COGGESHALL, R.E. Localization and activation of glutamate receptors in unmyelinated axons of rat glabrous skin. **Neurosci Lett.**,v.197, p.25–8, 1995.

CASHMAN, J.; McANULTY, G. Nosteroidal anti-inflammatory drugs in persurgical pain management: mechanisms of action and rational for optimum use. **Drugs**, v.49, p.51-70, 1995.

CAVARA, N.A.; ORTH, A.; HOLLMANN, M.Effects of NR1 splicing on NR1/NR3B-type excitatory glycine Receptors. **BMC Neuroscience**,v.10, p.32, 2009.

CHAVES, H. V.; RIBEIRO, R.A.; SOUZA A. M. B.; SILVA, A.A.R.; GOMES, A.S.; VALE, M. L.; , BEZERRA, M.M.; BRITO, G.A.C. Experimental Model of Zymosan-Induced Arthritis in the Rat Temporomandibular Joint: Role of Nitric Oxide and Neutrophils. **J Biomed Biotechnol.**, v.2011, p.1-11, 2011.

CHIANG, C.Y.; JAMES, W.; SESSLE, B.J. NMDA Receptor Involvement in Neuroplastic Changes Induced By Neonatal Capsaicin Treatment in Trigeminal Nociceptive Neurons. **J Neurophysiol.**, v.78, p.2799-2803, 1997.

CHIZH, B.A.; HEADLEY, P.M.; TZSCHENTKE, T.M. NMDA receptor antagonists as analgesics: focus on the NR2B subtype. **Trends Pharmacol Sci.**, v.22, p.636–42, 2001.

CODERRE, T. J.; KATZ, J.; VACCARINO, A. L.; Melzack, R. Contribution of central neuroplasticity to pathological pain: Review of clinical and experimental evidence. **Pain**, v.52, p. 259–285, 1993.

COGGESHALL, R.E.; CARLTON, S.M. Ultrastructural analysis of NMDA, AMPA, and kainate receptors on unmyelinated and myelinated axons in the periphery. **J Comp Neurol**, v.391, p.78–86, 1998.

COOKE, S. F.; BLISS, T.V.P. Plasticity in the human central nervous system. **Brain**, v.129, p.1659–1673, 2006.

CROSBY, V.; WILCOCK, A.; RAY, C. The Safety and Efficacy of a Single Dose(500 mg or 1 g) of Intravenous Magnesium Sulfate in Neuropathic Pain Poorly Responsive to Strong Opioid Analgesics in Patients with Cancer. **Journal of Pain and Symptom Management**, v.19, n.1, p.35-39, 2000.

CUNHA, F. Q; POOLE, S.; LORENZETTI, B. B; FERREIRA, S. H. The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. **Br J Pharmacol.**, v.107, p.660–664, 1992.

DAE, J. K.; PENGCHENG, X.; LIU, K.; LORIA, C.; YOKOTA, K.; JACOBS, D. R.; HE, K. Magnesium Intake in Relation to Systemic Inflammation, Insulin Resistance, and the Incidence of Diabetes. **Epidemiology/Health Services Research**, v.33, p. 2604–2610, 2010.

DAS, S.; SASAKI, Y.F.; ROTHE, T.; PREMKUMAR, L.S.; TAKASU, M.; CRANDALL, J.E.; DIKES, P.; CONNER, D.A.; RAYUDU, P.V.; CHEUNG, W.; CHEN, H.S.; LIPTON, S.A.; NAKANISHI, N. Increased NMDA current and spine density in mice lacking the NMDA receptor subunit NR3A. **Nature**, v. 393, p.377–381, 1998.

DAVAR, G.; HAMA, A.; DEYKIN, A.; VOS, B.; MACIEWICZ, R. MK-801 blocks the development of thermal hyperalgesia in a rat model of experimental painful neuropathy. **Brain Res.**, v.553, p.327–330, 1991.

DEL CASTILLO, J. & ENGBAEK, L.. The nature of the neuromuscular block produced by magnesium. **J Physiol.**, n.124, p.370-384,1954.

DEL CASTILLO, J.; STARK, L. The effect of calcium ions on the motor end-plate potentials. **J Physiol.**, n.116, p.507-515, 1952.

DENADAI-SOUZA, A.; CAMARGO, L.L.; RIBELA, M.T.; KEEBLE, J.E.; COSTA S.K.; MUSCARÁ, M.N. Participation of peripheral tachykinin NK1 receptors in the carrageenan-induced inflammation of the rat temporomandibular joint. **Eur J Pain**, v.13, p.812-819, 2009.

DONALSON, D.; KROENING, R. Recognition and treatment of patients with chronic orofacial pain. **Am Dent Assoc.**, v.99, p.961-966, 1979.

DOUGHERTY, P.M.; PALECEK, J.; WILLIS, Jr. Does sensitization of responses to excitatory amino acids underlie the psychophysical reports for two modalities of increased sensitivity in zones of secondary hyperalgesia? **J Am Pain Soc.**, v.2, p.276-279, 1993.

DOUGHERTY, P. M.; LENZ, F. A. Plasticity of the somatosensory system following neural injury. In: BOIVIE, J.; HANSSON, P.; LINDBLUM, U. editors. Touch, Temperature, and Pain in Health and Disease: Mechanisms and Assessments. Progress in Pain Research and Management. Seattle: IASP Press, p.439-460, 1994.

DUBNER R. Neural basis of persistent pain: sensory specialization, sensory modulation, and neuronal plasticity. In: JENSEN, T. S.; TURNER, J. A.; WIESENFELD-HALLIN, Z. Proceedings of the 8th World Congress on Pain, Progress in Pain Research and Management. Seattle: IASP Press, p. 243-257, 1997.

DUBNER, R. Brainstem Mechanism of Persistent Pain Following Injury. **Journal of Orofacial Pain**, v.18, n.13, 2004.

DUBNER, R.; RUDA, M. Activity-dependent neuronal plasticity following tissue injury and inflammation. **Trends Neurosci.**, v.15, p.96-103, 1989.

DUBRAY, C.; ALLOUI, A.; BARDIN, L.; ROCK, E.; MAZUR, A.; RAYSSIGUIER, Y.; ESCHALIER, A.; LAVARENNE, J. Magnesium deficiency induced an hyperalgesia reversed by the NMDA receptor antagonist MK-801. **Neuroreport**, v.8, p.1383-1386, 1997.

EIDE, P.K. Wind-up and the NMDA receptor complex from a clinical perspective. **European Journal of Pain**, v.4, p.5-17, 2000.

EVANS, R.H.; FRANCIS, A.A.; WATKINS, J.C. Mg²⁺ like selective antagonism of excitatory amino acid induced responses by alpha-epsilon-diaminopimelic acid, D-alpha-amino adipate and HA-996 in isolated spinal cord of frog and immature rat. **Brain Res.**, v.148, p.536-542, 1978.

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

FELSBY, S.; NEILSON, J.; ARENDT-NEILSON, L.; JENSEN, T.S. NMDA receptor blockade in chronic neuropathic pain: a comparison of ketamine and magnesium chloride. **Pain**, v.64, p.283-291, 1995.

FERIA, M.; ABAD, F.; SÁNCHEZ, A.; PEDRO, A. Magnesium sulphate injected subcutaneously suppresses autotomy in peripherally deafferented rats. **Pain**, v. 53, n.3, p. 287-293, 1993.

FERREIRA, S.H.; FERRARI, L.F.; CUNHA, T.M.; NASCIMENTO, P.G.B.D.; JUNIOR, W.A.V.J.; CUNHA, F. Q. Dor inflamatória. In: NETO, O.A.; COSTA, C.M.C.; SIQUEIRA, J.T.T.; TEIXEIRA, M.J. E COLABS. Dor: Princípios e Práticas. Porto Alegre: Atmed, p.146-188, 2009.

FERREIRA, S.H.; LORENZETTI, B.B.; POOLE, S. Bradykinin initiates cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.**, v.110, n.3, p.1227-1231, 1993.

FIROZ, M.; GRABER, M. Bioavailability of US commercial magnesium preparations. **Magnes Res.**, v.14, n.4, p.257-62, 2001.

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

FISHER, K.; CODERRE, T.J; HAGEN, N.A. Targeting *N*-methyl-d-aspartate receptor for chronic pain management: preclinical animal studies, recent clinical experience and future research directions. **J Pain Symptom Manage**, v.20, p. 358–73, 2000.

FORMAN, S.A.; CHOU, J.; STRICHARTZ, G.R.; LO, E.H. Farmacologia da Neurotransmissão Gabaérgica e Glutamatérgica. In: GOLAN, D.E.; TASHJIAN, A.H.; ARMSTRONG, E.J.; ARMSTRONG, A.W. Princípios de Farmacologia: A Base Fisiopatológica da Farmacoterapia. 2009. 2ª ed., cap.11, p.158.

FRICTON, J.R.; Ronald, D. dor e desordens temporomandibulares. Ed Santos. São Paulo. P. 43-60, 2003.

FU, L.; TANG, R.; BAO, N.; WANG, J., MA, H. Ketamine and propofol in combination induce neuroapoptosis and down-regulate the expression of *N*-methyl-D-aspartate glutamate receptor NR2B subunit in rat forebrain culture. **Pharmazie**, v.66, n. 10, p. 771-776, 2011.

GALLAGHER, M.J; HUANG H, PRITCHETT, D.B; LYNCH, D.R. Interactions between ifenprodil and the NR2B subunit of the *N*-methyl-d-aspartate receptor. **J Biol Chem.**, v.271, p.9603–9611, 1996.

GARCIA L. J.; HARMAMURA L.; LEITE M.P.; ROCHA E SILVA M. Pharmacological Analysis Of Local The Acute Inflammatory Process Induced In The Rat'S Paw By Local Injection Of Carrageem And By Heating. **British Journal Pharmacology**, v. 48, p. 88-96, 1993.

GAUNITZ, C.; SCHÜTTLER, A.; GILLEN, C.; ALLGAIER, C. Formalin-induced changes of NMDA receptor subunit expression in the spinal cord of the rat. **Amino Acids**, v.23, p.177–182, 2002.

GÓES, P.S.A. The prevalence, severity and impact of dental pain in Brazilian schoolchildren and their families. Tese: Doutorado em epidemiologia and Dental Public Health) – University: prevalence of London, London, 2001.

GUO, H.; HUANG, L.-Y. M. Alteration in the voltage dependence of NMDA receptor channels in rat dorsal horn neurones following peripheral inflammation. **Journal of Physiology**, v.537, n.1, p.115–123, 2001.

GUO, W.; WANG, H.; WATANABE, M.; SHIMIZU, K.; ZOU, S.; LAGRAIZE, S.C. et al. Glialcytokine-neuronal interactions underlying the mechanisms of persistent pain. **J Neurosci.**, v.27, p.6006–18, 2007.

HARGREAVES, K.M.; BOWELS, W.R.; GARRY, G. An *in vitro* method to evaluate regulation of neuropeptide release from pulp dental. **J endodontics**, v.18, p.597-600, 1992.

HARGREAVES, K.M.; MARK, T.R.; DOUGLAS, J.; JAMES, Q.S. Dor orofacial: mecanismo periféricos. In: James R.F; Ronald D. dor e desordens temporomandibulares. Ed Santos. São Paulo. 2003. p.33- 422.

HAAS, D.A.; NAKANISHI, O.; MACMILLAN, R.E.; JORDAN, R.C.; HU, J.W. Development of an orofacial model of acute inflammation. **Archs Oral Biol.**,v.37, p.417–422, 1992.

HAEUCH, Y.; MATSUMOTO, K.; ICHIKAWA, H.; MAEDA, S. Immunohistochemical demonstration of neuropeptides in the articular disk of the human temporomandibular joint. **Cell Tissue Org.**, v. 164, p. 205-211, 1999.

HALLAK, M.R.F.; BERMAN, S.M.; IRTENKAUF, C.; JANUSZ, AND D.B. COTTON. Magnesium sulfate treatment decreases N-methyl-D-aspartate receptor binding in the rat brain: An autoradiographic study. **J Soc Gynecol Invest.**, n.1, p.25-30, 1994.

HELLER, P.H.; GEAR, R.; LEVINE, J.D. Short-term pain control long-term consequences? **Am Pain Soc Bull.**, n.2, p.12-15, 1992.

HELMY E.S; BAYS R.A; SHARAW.Y. M. Osteoarthritis of the temporomandibular joint following experimental disc perforation in *Macaca fascicularis*. **J Oral Maxillofac Surg.**, n.23, v.46, p.979–990, 1988.

HELLER, P.H.; GREEN, P.G.; TANNER, K.D.; MIAO, F.J.P.; LEVINE, J.D. Contribuições Neurais e Periféricas para a inflamação. In: JAMES, R.F.; RONALD, D. dor e desordens temporomandibulares. Ed Santos. São Paulo. p.43-60, 2003.

HENSON, M.A.; ROBERTS, A.C.; PEREZ-OTANO, I.; PHILPOT, B.D. Influence of the NR3A subunit on NMDA receptor functions. **Prog Neurobiol.**, v.91, p.23–37, 2010.

HEWITT, D.J. The use of NMDA-receptor antagonists in the treatment of chronic pain. **Clin J Pain**, v.16, p.73–9, 2000.

HONG-TAO, L.; HOLLMANN, M.W.; WEI-HUA, L.; HOENEMANN, C.W.; MARCEL, E.D. Modulation of NMDA Receptor Function by Ketamine and Magnesium: Part I. **Anesth Analg.**, v.92, p.1173–81, 2001.

HUA GUO AND L.-Y. M. HUANG. Alteration in the voltage dependence of NMDA receptor channels in rat dorsal horn neurones following peripheral inflammation. **Journal of Physiology**, v.537, p.115–123, 2001.

HUTTER, O. F.; KOSTIAL, K. Effect of magnesium and calcium ions on the release of acetylcholine. **J. Physiol.**, n.124, p.234-271, 1954.

IMAI, H; SAKAMOTO, I; YODA T; YAMASHITA, Y. A model for internal derangement and osteoarthritis of the temporomandibular joint with experimental traction of the mandibular ramus in rabbit. **Oral Diseases**, v.7, p.2008, 2008.

ISHIMARU, J; GOSS, A.N. A model for Osteoarthritis of the temporomandibular Joint. **J Oral Maxillofac Surg.**, v.50, p.1191-1195, 1992.

JAEGER B. Cefaléia tipo tensão e dor orofacial.in. Dor orofacial e desordens temporomandibulares. JAMES R FRICTON, RONALD DUBNER. Raven Publishers. Livraria Santos Editora LTDA. 2003. p.205-214.

JENNIFER, M.; JANOWSKY, L.A. The N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2B: localization, functional properties, regulation, and clinical implications. **Pharmacology & Therapeutics**, v.97, p.55–85, 2003.

JOHNSON, J. W.; ASCHER, P. Voltage-dependent block by intracellular Mg²⁺ of N-methyl-D-aspartate-activated channels. *Biophys. J. Biophysical Society*, v. 57, p.1085-1090, 1990.

KARLSSON, U.J.; DIN, S.J.; MOLLER, K.A.; JOHANSSON, S.; WIKSTROM, L.; NASSTROM, J. Glutamate-induced currents reveal three functionally distinct NMDA receptor populations in rat dorsal horn effects of peripheral nerve lesion and inflammation. **Neuroscience**, v.112, n. 4, p. 861-868, 2002.

KAWAMATA, M.; OMOTE, K. Involvement of increased excitatory amino acids and intracellular Ca²⁺ concentration in the spinal dorsal horn in an animal model of neuropathic pain. **Pain**, v.68, p.85–96, 1996.

KENJI, M.; ZHOU, Q.-Q.; GUO, W.Y.; GUAN, R. TERAYAMA, R.; DUBNER, R.; REN, K. Changes in Gene Expression and Neuronal Phenotype in Brain Stem Pain Modulatory Circuitry After Inflammation. **J Neurophysiol.**, v.87, n.10, p.750–760, 2002.

KERINS, C.A.; CARLSON, D.S; MCINTOSH, J.E; BELLINGER, L.L. Meal pattern changes associated with temporomandibular joint inflammation/pain in rats; analgesic effects. **Pharmacol Biochem Behav.**, v.75,p.181–189, 2003.

KIDD, P. M. Integrated brain restoration after ischemic stroke--medical management, risk factors, nutrients, and other interventions for managing inflammation and enhancing brain plasticity. **Altern Med Rev.**, v. 14, n. 1, p. 14-35, 2009.

KIDO, M.A.; KIYOSHIMA, T.; KONDO, T.; AYASAKA, N.; MOROI, R.; TEREDA, Y.; TANAKA, T. Distribution of substance P and calcitonin gene-related peptide-like immunoreactive nerve fibers in the rat temporomandibular joint. **J Dent Res.**, v.72, p. 592-98, 1993.

KIM, H-W.; CHANG, Y.C.; CHEN M.; RAPOPORT, S.; JAGADEESH, S.R. Chronic NMDA administration to rats increases brain pro-apoptotic factors while decreasing anti-Apoptotic factors and causes cell death. **BMC Neuroscience**, v.10, p.123, 2009.

KOVACIC, P.; SOMANATHAN, R. Clinical physiology and mechanism of dizocilpine (MK-801): electron transfer, radicals, redox metabolites and bioactivity. **Oxid Med Cell Longev**, v.3, n.1, p.13-22, 2010.

KUS, L.; SANDERSON, J.J.; BEITZ, A. J. after unilateral n-methyl-d-aspartate receptor messenger rna and mk-801 binding decrease in rat spinal cord l hind paw inflammation. **Neuroscience**, v.68, n. 1, p. 159-165, 1995.

KYRKANIDES, S.; TALLENTS, R.H.; MACHER, D.J.; OLSCHOWKA, J.A.; STEVENS S.Y. Temporomandibular Joint Nociception: Effects of Capsaicin on Substance P-like Immunoreactivity in the Rabbit Brain Stem. **Journal of Orofacial Pain**, v. 16, n.3, p.229-236, 2002.

LAM, D. K.; SESSLE, B.J.; CAIRNS, B.E.; JAMES, W.H. Neural mechanisms of temporomandibular joint and masticatory muscle pain: A possible role for peripheral glutamate receptor mechanisms. **Pain Res Manage**, v.10, n.3, p.145-152, 2005.

LAM, D.K.; BARRY J.S.; JAMES, W.H. Glutamate and capsaicin effects on trigeminal nociception I: Activation and peripheral sensitization of deep craniofacial nociceptive afferents. **Brain Res. January**, v. 28, n.1251, p.130-139, 2009.

LAWAND, N.B.; WILLIS, W.D.; WESTLUND, K.N. Excitatory amino acid receptor involvement in peripheral nociceptive transmission in rats. **Eur J Pharmacol.**, v.324, p.169-77, 1997.

LAZAROV, N.E. Comparative analysis of the chemical neuroanatomy of the mammalian trigeminal ganglion and mesencephalic trigeminal nucleus. **Progress in Neurobiology**, v. 66, p. 19-59, 2002.

LEKKAS C. Experimental degenerative temporomandibular joint disease. **Int J Oral Maxillofac Surg.**, v.23, p.423-, 1994.

LEEM, J.W.; WILLIS, W.D.; CHUNG, J.M. Cutaneous Sensory receptors in the Rat Foot. **J Neurophysiol.** v.69, p.1684-99, 1993.

LI, J.; SIMONE, D. A.; LARSON, A. A. Windup leads to characteristics of central sensitization. **Pain**, v.79, p.75-82, 1999.

LIAO, G.Y.; WAGNER D.A.; HSU, M.H.; LEONARD, J.P. Evidence for direct protein kinase-C mediated modulation of N-methyl-d-aspartate receptor current. **Mol Pharmacol.**, v.59, p.960-40, 2001.

LIPTON, J.A.; SHIP J.A.; LARACH-ROBINSON, D. Estimated prevalence and distribution of reported orofacial pain in the united states. **J Am. Dent. Assoc.**, v.114, p115-121, 1993.

LIU, H.T.; HOLLMANN, W.H.; LIU,C.W;. HOENEMANN , M.E.; DURIEUX, M.W. Modulation of NMDA receptor function by ketamine and magnesium: Part I. **Anesth Analg.**, n.92, v.5, p. 1173-1181, 2001.

LIU, L.; SIMON, S.A. Modulation of *I* A Currents by Capsaicin in Rat Trigeminal Ganglion Neurons. **J Neurophysiol.**, v.89, p.1387-1401, 2003.

LO, B.; HOENEMANN, C.W.; DURIEUX, M.E. Preemptive analgesia: ketamine and magnesium reduce postoperative morphine requirements after abdominal hysterectomy. **Anesthesiology**,v.89, p.A1163, 1998.

LODGE, D.; JOHNSON, K.M. Noncompetitive excitatory amino acid receptor antagonists. **Trends Pharmacol Sci.**,v.11, p.81– 6, 1990.

LOFTIS, M. J.; JANOWSKY, A.; The N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2B: localization, functional properties, regulation, and clinical implications. **Pharmacology & Therapeutics**, v.97, p.55– 85, 2003.

LOTZ, M.; CARSON, D. Effect of neuropeptides on production of inflammatory cytokines by human monocytes. **Science**,v.235, p.893-895, 1988.

LU, W.Y.; XIONG, Z.G.; LEI, S. ET AL. G-protein-coupled receptors act via protein kinase C and Src to regulate NMDA receptors. **Nat Neurosci.**, v.2, p.331–8, 1999.

MA, Q.P.; HARGREAVES, R.J. Localization of *N*-methyl-d-aspartate NR2B subunits on primary sensory neurons that give rise to small-caliber sciatic nerve fibers in rats. **Neuroscience**, v.101, p.699–707, 2000.

MACFARLANE, T. BLINKHORN, A.S.; DAVIES, R.M.; KINCEY, J.; WORTHINGTON, H.V. Orofacial pain in the community and associated impact. *Community Dent.* **Oral Epidemiol.**, v.30, p.52-60, 2002.

MCNEARNEY, T.A.; SPEEGLE, D.; LAWAND, N.; LISSE, J.; WESTLUND, K. Excitatory Amino Acid Profiles of Synovial Fluid from Patients with Arthritis. **J. Rheumatology**, v.27, n.3, p.739-45, 2000.

MAILE, A.; ROBERTS, H.C.; PEREZ-OTANO, I.; PHILPOT, B.D. Influence of the NR3A subunit on NMDA receptor functions. **Progress in Neurobiology**, v.91,p. 23– 37, 2010.

MALMBERG, A.; YAKSH, T. Spinal nitric oxide sythesis inhibition blocks NMDA-induced thermal hyperalgesia and produces antinociception. **Pain**, v.54, n.3, p.291-300, 1993.

MARVIZON, J.C.; MCROBERTS, J.A.; ENNES, H.S.; SONG, B.; WANG, X.; JINTON, L.; CORNELIUSSEN, B.; MAYER, E.A. Two *N*-methyl-daspartate receptors in rat dorsal root ganglia with different subunit composition and localization. **J Comp Neurol.**, v.446, p.325–41, 2002.

MASCARO, M.B.; SOUZA, M.R.; PICOLI, L. C.; PROSDÓCIMI, F.C. O complexo trigeminal e as desordens da motricidade mandibular. **ConScientiae Saúde**, v.7, n.4, p.449-456, 2008.

MAUSKOP, A.; ALTURA, B.T.; CRACCO, R.Q.; ALTURA, B.M. Intravenous magnesium sulfate relieves migraine attacks in patients with low serum ionised magnesium levels: a pilot study. **Clin Sci.**, v. 89, p.633–636, 1995.

MAYER, M.L.; WESTBROOK, G.L.; GUTHRIE, P.B. Voltage-dependent block of magnesium of NMDA responses in spinal cord neurons. **Nature**, v.309, p. 261–263, 1984.

MAZUR, A.; JEANETTE, A.M.; EDMOND, R.; GUEUX, E.; NOWACKI, W.; RAYSSIGUIER, Y. Magnesium and the inflammatory response: Potential physiopathological implications. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.458, p. 48–56, 2007.

MAZZETO, M.O.; CARNIEL, I.C.; FIGUEIREDO, M.A.C. Alterações psicossociais em pacientes com Desordens Craniomandibulares. **Jornal Brasileiro de ATM**, v.1, n.3, p.233-243, 2001.

MERRILL, R.L. Orofacial Pain Mechanisms and their Clinical Application Orofacial Pain Mechanisms and their Clinical Application. **Journal of American Pain Society**, v.1, n.4, p.335-349, 2001.

MICHAEL W SALTER. Cellular Neuro plasticity Mechanisms Mediating Pain. **Journal of orofacial Pain**. V. 18, n. 4, p. 93-99, 2004.

MIHARA, Y.; EGASHIRA, N.; SADA, H.; KAWASHIRI, T.; USHIO, S.; YANO, T.; IKESUE, H.; OISHI, R. Involvement of spinal NR2B-containing NMDA receptors in oxaliplatin-induced mechanical allodynia in rats. **Molecular Pain**, v.7, p.8-13, 2011.

MIKI, K.; ZHOU, Q. Q.; GUO, W.; GUAN, Y.; TERAYAMA, R.; DUBNER, R.; REN, K. Changes in Gene Expression and Neuronal Phenotype in Brain Stem Pain Modulatory Circuitry After Inflammation. **J Neurophysiol.**, v. 87, p. 750–760, 2002.

MILAM, S.B. Pathophysiology and epidemiology of TMJ. **J Musculoskel Neuron Interact**, v.3, n.4, p.382-390, 2003.

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

MONYER, H.; BURNASHEV, N.; LAURIE, D. J.; SAKMANN, B.; SEEBURG. P.; Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. **Neuron.**, v.12, n.3, p.529-540, 1994.

MORI, H.; MISHINA, M. Structure and function of the NMDA receptor channel. **Neuropharmacology**, v.34, p.1219–37, 1995.

MOTT, D.D.; DOHERTY, J.J.; ZHANG, S. ET AL. Phenylethanolamines inhibit NMDA receptors by enhancing proton inhibition. **NatNeurosci**, v.1, p.659–67, 1998.

NABCKURA, J.; KAWAMOTO, I.; AKAIKIC, N. Developmental change in voltage dependency of NMDA receptor-mediated response in nucleustractus solitarii neurons. **Brain Res.**, v.64, p.152-156, 1994.

NRC (NATIONALA RESEARCH COUNCIL). Diet and Health: implications for Reducing Chronic Disease Risk. Report of the commite on Diet and Health. Food and Nutrition Board. Commission Life Sciences. National Academy Press. Washigto. D.C. p.750, 1989.

NAKANISHI, N.; TU, S.; SHIN, Y.; CUI, J.; KUROKAWA, T.; ZHANG, D.; CHEN, H-S. V.; TONG, G.; LIPTON, S.A. Neuroprotection by the NR3A Subunit of the NMDA Receptor. **The Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 29, p.5260–5265, 2009.

NOGUCHI, K.; DUBNER, R.; DE LEON, M.; SENBA, E.; AND RUDA, M.A. Axotomy induces preprotachykinin gene expression in subpopulation of dorsal root ganglion neurons. **J Neurosci Res.**, v.37, p.596–603, 1994.

OKESON, J.P. Dores Bucofaciais de Bell. 6ª edição, quintesence, 2006, pag 28-29.

OLGART, L.; GALZELIU, B.; BRODIN, E.; NILSSON, G. Release of substance P-like Immunoreactivity from the dental pulp. **Acta Physiol Scand.**, v.101, p.510-700, 1997.

OLIVAR, T.; LAIRD, J.M. Differential effects of *N*-methyl-d-aspartate receptor blockade on nociceptive somatic and visceral reflexes. **Pain**,v.79, p.67–73, 1999.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The Rat Brainin Stereotaxic Coordinates. Academic Press, Inc.3ª edition.USA, San Diego, California. 1997, p.60-123.

PENG, J.M.; XU, L.S.; ZHU, Q.; GONG, S.; YU, X.M.; GUO, S.Y.; WU, G.C.; TAO, J.; JIANG, X.H. Enhanced NMDA receptor NR1 phosphorylation and neuronal activity in the arcuate nucleus of hypothalamus following peripheral inflammation. **Acta Pharmacol Sin.**, v.32, n.2, p.160-6, 2011.

PEREZ-OTANO, I.; SCHULTIES, C. T.; CONTRACTOR, A.; LIPTON, S. A.; TRIMMER J. S.; SUCHER, N. J.; HEINEMANN, S. F. Assembly with NR1 subunit is required for surface expression of NR3A-containing NMDA receptors. **J Neurosci.**, v. 21, p.175-218, 2001.

PETRENKO, A.B.; BABA, T.Y.H.; SHIMOJI, K. The Role of N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) Receptors in Pain:A Review. **Anesth Analg.**,v.97, p.108 –16, 2003.

PETRENKO, A.B.; YAMAKURA, T.; BABA, H.; SAKIMURA, K. Unaltered pain-related behavior in mice lacking NMDA receptor GluR epsilon 1 subunit. **Neurosci Res.**, v.46, p.199–204, 2003.

PF AFF, L. M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res.**,v.29, p.45, 2001.

PRADO, W. Medicamentos analgésicos de ação central. In: GRAEFF, F.G.; GUIMARÃES, F. S. *Fundamentos de psicofarmacologia*. São Paulo: Atheneu, 1999. p.219-230.

REN, K.; DUBNER, R. Central Nervous System Plasticity and Persistent Pain. **Journal of Orofacial Pain**, v.13, n.3, p.104-111, 1999.

RILEY, J.L.; GILBERT, G.H. Orofacial pain symptoms: an interaction between age and sex. **Pain**, v.90, n.4, p.245-256, 2001.

RONALD DUBNER. Brainstem Mechanism of Persistent Pain Following Injury. **Journal of Orofacial Pain**, v.18, n.4, p.299-305, 2004.

ROVERONI, R.C.; PARADA, C.A.; VEIGA, M.C.F.A.; TAMBELLI, C.H. Development of a behavioral model of TMJ pain in rats: the TMJ formalin test. **Pain**, v.94, p.185-191, 2001.

SAKURADA, K.; MASU, M.; NAKANISHI, S. Alteration of Ca²⁺ Permeability and Sensitivity to Mg²⁺ and Channel Blockers by a Single Amino Acid Substitution in the N-Methyl-Daspartate Receptor. **J Biol Chem.**, v.5, n.268, p.410-5, 1993.

SALTER, M.W. Cellular neuroplasticity mechanism mediating pain persistence. **J Orofac Pain**, v.18, n. 4, p.318-324, 2004.

SARIS N-E. L.; MERVAALA, E.; KARPPANEN, H.; KHAWAJA, J. A.; LEWENSTAM, A. Magnesium An update on physiological, clinical and analytical aspects. **Clinica Chimica Acta.**,v. 294, p.1-26, 2000.

SATO, T.; KITAGAWA, J.; REN, K.; TANAKA, H. Activation of trigeminal intranuclear pathway in rats with temporomandibular joint inflammation. **Journal of Oral Science**, v. 47, n. 2, p.65-69, 2005.

SERODIO, P.;RUDY, B. Differential expression of Kv4 K⁺ channel subunits mediating subthreshold transient K⁺ (A-type). currents in rat brain. **Journal of Neurophysiology**, v.79,p.1081-1091,1998.

SESSLE, BARRY J. Acute And Chronic Craniofacial Pain: Brainstem Mechanisms Of Nociceptive Transmission Andneuroplasticity, And Their Clinical Correlatescrit. **Rev Oral Biol Med.**, v.11, n. 1, p.57-91, 2000.

SESSLE, BARRY J. Mecanismos periféricos e centrais da dor orofacial e suas correlações clínicas. In. *Dor Princípios e Prática*. Ed. ARTMED 2009, Pag 189-204.

SESSLE, BARRY, J. Mecanismo da dor orofacial no tronco cerebral. In: JAMES, R.F.; RONALD, D. dor e desordens temporomandibulares. 2003. Ed Santos .São Paulo. Pag 43-60.

SESSLE, B. J. Acute And Chronic Craniofacial Pain: Brainstem Mechanisms Of Nociceptive Transmission And Neuroplasticity, And Their Clinical Correlates. **Crit Rev Oral Biol.**, v. 1,n. 1, p. 57-91, 2000.

SCHIAIBL, H.; SHIMIDT, R. Discharge characteristics of receptor with fine afferents from normal and inflamed joints: influence of analgesics and prostaglandins. **Agentes Actions**, v.105, p.231-254, 1986.

SHENG, M.; PAK, D.T. Ligand-gated ion channel interactions with cytoskeletal and signaling proteins. **Annu Rev Physiol**, v.62, p.755–78, 2000.

SHIMIZU, K.; GUO, W.; WANG, H.; ZOU, S.; LAGRAIZE, S.C.; IWATA, K.; WEI F.; DUBNER, R.; REN, K. Differential involvement of trigeminal transition zone and laminated subnucleus caudalis in orofacial deep and cutaneous hyperalgesia: the effects of interleukin-10 and glial inhibitors. **Molecular Pain**, v.5, n.23, p.75-79, 2009.

SILVIA, A.; TESSER-VISCAÍNO; ALEXANDRE, DENADAI-SOUZA; SIMONE, A. TEIXEIRA; EDÍLSON ERVOLINO; ROELF, J. CRUZ-RIZZOLO; SORAIA, K. COSTA; MARCELO, N. MUSCARÁ; CLÁUDIO, A. CASATTI. Putative antinociceptive action of nitric oxide in the caudal part of the spinal trigeminal nucleus during chronic carrageenan-induced arthritis in the rat temporomandibular joint. **Brain Research**, v.1302, p. 85-96, 2009.

SILVA, L. F. S.; WALDERB, R. Y.; DAVIDSONC, B. L.; WILSOND, S. P.; SLUKA, K. A. Changes in expression of NMDA-NR1 receptor subunits in the rostral ventromedial medulla modulates pain behaviors. **Pain**, v.151, n.1, p.155–161, 2010.

SMITH, C.H.; BARKER, J.N.; MORRIS, R.W.; MACDONALD, D.M.; LEE, T.H. Neuropeptides induce rapid expression of endothelial cell adhesion molecules and elicit granulocytic infiltration in human skin. **J. Immunol.**, v.151, n.6, p.3274- 3282, 1993.

SMITH, G.D.; WISEMAN, J.; HARRISON, S.M.; ELLIOTT, P.J.; BIRCH, P.J. Pretreatment with MK-801, a non-competitive NMDA antagonist, prevents development of mechanical hyperalgesia in a rat model of chronic neuropathy, but not in a model of chronic inflammation. **Neurosci Lett.**, v.165, p. 79–83, 1994.

SMITH, G.D.; WISEMAN, J.; HARRISON, S.M.; ELLIOTT, P.J.; BIRCH, P.J. Pretreatment with MK-801, a non-competitive NMDA antagonist, prevents development of mechanical hyperalgesia in a rat model of chronic neuropathy, but not in a model of chronic inflammation. **Neurosci Lett.**, v.165, p.79–83, 1994.

SPASOV, A.A.; PETROV, V.I.; IEZHITSA, I.N.; KRAVCHENKO, M.S.; KHARITONOVA, M.V.; OZEROV, A.A. Comparative study of magnesium salts bioavailability in rats fed a magnesium-deficient diet. **Vestn Ross Akad Med Nauk.**, v.2, p.29-37, 2010.

SPILLER, R. C. Inflammation as a basis for functional GI disorders. **Best Practice and Research Gastroenterology**, v. 18, n. 4, p. 641-661, 2004.

STUART, G.; LESZKIEWICZ, D.N. Role of Distinct NMDA Receptor Subtypes at Central Synapses. Downloaded from stke.sciencemag.org on July 14, 2011.

STÜHLINGER, H-G. Magnesium in Cardiovascular Disease. **Journal of Clinical and Basic Cardiology**, v.5, n.1,p.55-59, 2002.

Subcommittee on Taxonomy. Pain terms: a list with definitions and notes on usage. **Pain**, v.6, p.249-52, 1979.

SUCHER, N. J.; AWOBULUYI, M.; CHOI, Y. B. LIPTON, S. A. NMDA receptors : from genes to channels. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.17, p. 348-355, 1996.

SUGIYO, S.; TAKEMURA, M.; DUBNER, R.; REN, K. Trigeminal Transition Zone/Rostral Ventromedial Medulla Connections and Facilitation of Orofacial Hyperalgesia after Masseter Inflammation in Rats. **The Journal Of Comparative Neurology**, v. 493, p.510–523, 2005.

SUTOR, B.; JORDAN, W.; ZIEGLGINSBERGER, W. Evidence for a magnesium-insensitive membrane resistance increase during NMDA-induced depolarizations in rat neocortical neurons in vitro. **Neuroscience Letters**, v. 75, p. 317-322, 1987.

TAKEDA, M.; TANIMOTO, T.; IKEDA, M.; NASU, M. Temporomandibular Joint inflammation Potentiates the Excitability of Trigeminal Root Ganglion Neurons Innervating the Facial Skin in Rats. **J Neurophysiol.**, v.93, p.2723–2738, 2005.

TAKAHASHI, K.; WATANABE, M.; SUEKAWA, Y.; ITO, GOSHI.; INUBUSHI T. IL-1beta in the trigeminal subnucleus caudalis contributes to extra-territorial allodynia/hyperalgesia following a trigeminal nerve injury. **European Journal of Pain**, v.15, n.5, p.467–467, 2011.

TAKEUCHI, Y.; ZEREDO, J.L.; FUJIYAMA, R.; AMAGASA, T.; TODA, K. Effects of experimentally induced inflammation on temporomandibular joint nociceptors in rats. **Neurosci Lett.**, v.354, n.172–174, 2004.

TANIGUCHI, K.; SHINJO, K.; MIZUTANI, M.; SHIMADA, K.; ISHIKAWA, T.; MENNITI, F.S.; NAGAHISA, A. Antinociceptive activity of CP-101, 606, an NMDA receptor NR2B subunit antagonist. **Br J Pharmacol.**, v.122, p.809–12, 1997.

TEIXEIRA, M.J. Fisiopatologia da Dor. In: NETO, O.A.; COSTA, C.M.C.; SIQUEIRA, J.T.T.; TEIXEIRA, M.J. e colabs. Dor: Principios e Práticas. Porto Alegre: Atmed, 2009. 146-188.

TEIXEIRA, M. JACOBSEN. Fisiopatologia da Nocicepção e da Supressão da Dor. Dor Orofacial/ATM. **Bases para o Diagnóstico Clínico**,v.8, n. 6, p.39-48, 2000.

TERAYAMA, R.; GUAN, Y.; DUBNER, R.; REN, K. Activity-induced plasticity in brain stem pain modulatory circuitry after inflammation. **Neuroreport**, v.11, p.1915–9, 2000.

TINGLEY, W.G.; MICHAEL, D.; KAMEYAMA, E.K.; DOHERTYJANINE, C.; PTAK, B.; RILEY C.T.; RICHARD, L.H. Characterization of Protein Kinase A and Protein Kinase C Phosphorylation of the *N*-Methyl-D-aspartate Receptor NR1 Subunit Using Phosphorylation Site-specific. **Antibodies**, v. 272, n. 8, p. 5157–5166, 1997.

TOMINAGA, K.; ALSTERGREN, P.; KURITA, H.; KOPP, S.. Clinical course of an antigen-induced arthritis model in the rabbit temporomandibular joint. **J. Oral Pathol. Med.**, v.28, p.268-273, 1999.

TONG, CHI-KUN.; KAFTAN, E.J.; MACDERMOTT, A.B. Functional identification of NR2 subunits contributing to NMDA receptors on substance P receptor-expressing dorsal horn neurons. **Molecular Pain**, v.4, p.44-49, 2008.

TOREBJÖRK, E.; LUNDBERG, L.E.; La MOTTE, R.H. Central changes in processing of mechanoreceptive input in capsaicin-induced secondary hyperalgesia in humans. **J Physiol.**, v.448, p.765-780, 1992.

TRAMER, M.R.; SCHNEIDER, J.; MARTI, R.A.; RIFAT, K. Role of magnesium sulfate in postoperative analgesia. **Anesthesiology**, v.84, p.340–347, 1996.

TONUSSI CR, FERREIRA SH. Rat knee-joint carrageenin incapacitation test: an objective screen for central and peripheral analgesics. **Pain**, v.48, p.421-7, 1992.

TONUSSI CR, FERREIRA SH. Bradykinin-induced knee joint incapacitation involves bradykinin B2 receptor mediated hyperalgesia and bradykinin B1 receptor-mediated nociception. **Eur J Pharmacol**, v.326, p.61-5, 1997.

TONUSSI CR, FERREIRA SH. Tumour necrosis factor-alpha mediates carrageenin-induced knee-joint incapacitation and also triggers overt nociception in previously inflamed rat knee-joints. **Pain**, v.82, p.81-7, 1999.

USDA. Continuing survey of food intake by individuals 1989 and 1990, USDA Public Use Data Tape, Washington, DC: USDA, 1990. In: Nils-Erik, L.; Sarisa, E.M.; Karppaneb, H.; Jahangir, A.; Lewenstam, A. Magnesium An update on physiological, clinical and analytical aspects. **Clinica Chimica Acta**, v.294, p.1–26, 2000.

USHIDA, T.; TANI, T.; KAWASAKI, M. ET AL. Peripheral administration of an *N*-methyl-d-aspartate receptor antagonist (MK-801) changes dorsal horn neuronal responses in rats. **Neurosci Lett**, v.260, p.89–92, 1999.

VALE, M.L. ; CUNHA, F.Q. ; BRITO, G. A.C. ; BENEVIDES, V.M. ; FERREIRA, S.H. ; POOLE S.; RIBEIRO, R.A. Anti-nociceptive effect of thalidomide on zymosan-induced experimental articular incapacitation. **Europ Journal of Pharmacology**, v.536, n. 3, p.309–317, 2006.

VERKHRATSKY, A.; KIRCHHOFF, F. NMDA Receptors in Glia. **The Neuroscientist**, v.13, n.1, 2007.

VILLA, G.; CERUTI, S.; ZANARDELLI, M.; MAGNI, G.; JASMIN, L.; OHARA, P.T.; ABBRACCHIO, M.P. Temporomandibular joint inflammation activates glial and immune cells in both the trigeminal ganglia and in the spinal trigeminal nucleus. **Molecular Pain**, v.6, p.89-93, 2010.

VILLANUEVA, L.; RABOISSON, P. Aspects périphériques et médullaires de la douleur trigéminal. **Réal Clin**, v.5, p.121-133, 1994.

VINCENT, C.; ANDREW, W.; RAY, C. The Safety and Efficacy of a Single Dose (500 mg or 1 g) of Intravenous Magnesium Sulfate in Neuropathic Pain Poorly Responsive to Strong Opioid Analgesics in Patients with Cancer. **Journal of Pain and Symptom Management**, v.19, n.1, 2000.

VINK, R.; COOK, N. L.; HEUVEL C. Magnesium in acute and chronic brain injury: an update. **Magnes Res.**, v.22, n.3, p.158-162, 2009.

WANG, H.; GUO W.; YANG, K.; WEI, F.; DUBNER, R.; REN, K. Contribution of Primary Afferent Input to Trigeminal Astroglial Hyperactivity, Cytokine Induction and NMDA Receptor Phosphorylation. **Open Pain J**, v.1, n.3, p.144–152, 2010.

WANG, S.; LIM, GREWO.; MAO, J.; SUNG, B.; MAO, J. Regulation of the trigeminal NR1 subunit expression induced by inflammation of the temporomandibular joint region in rats. **Pain**, v.141, p.97–103, 2009.

WATER, D.J.; ALLEN, T.G. J. Ca²⁺ permeable non-NMDA glutamate receptors in rat magnocellular basal forebrain neurons. *Journal of Physiology*, v.508, p.453–469, 1998.

WATKINS, L.R.; GEEHLER, L.E.; RELTON, L.; BREWER, M.T.; MEIER, S.F. Mechanisms of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) hyperalgesia. **Brain Res.**, v.692, n.1-2, p.244-250, 1995.

WIDENFALK, B.; WIBERG, M. Origin of sympathetic and sensory innervations of the temporomandibular joint. A retrograde axonal tracing study in the rat. **Neurosci Lett.**, v. 109, p.30-35, 1990.

WILCOX, G.L. Spinal mediators of nociceptive neurotransmission and hyperalgesia. **J Am Pain Soc.**, v.2, p.265-275, 1993
DICKSON, S. Differential effects of excitatory amino acids antagonists on dorsal horn nociceptive neurones in the rat. **Brain Res.**, v.506, p.31-39, 1990.

WILLIAMS K. IFENPRODIL. A novel NMDA receptor antagonist: site and mechanism of action. **Curr Drug Targets.**, v.2, p.285-98, 2001.

WILLIS, W. D.; SLUKA, K. A.; REES, H.; WESTLUND, K. N. Cooperative mechanisms of neurotransmitter action in central nervous sensitization. **Prog Brain Res.**, v. 110, p. 151–166, 1996.

WILLIS, W. Mechanical allodynia: a role for sensitized nociceptive tract cells with convergent input from mechanoreceptors and nociceptors? **J Am Pain Soc.**, v.2, p.23-33, 1993.

WHITE, J.; MASSEY, L.; GALES, S.K.; DITTUS, K.; CAMPBELL, K. Blood and urinary magnesium kinetics after oral magnesium supplements. **Clin Ther.**, v.14, p.678-87, 1992.

WODA, A. Pain in the Trigeminal System: from Orofacial Nociception to Neural Network Modeling. **J Dent Res.**, v.82, n.10, p.764-768, 2003.

WONG, E.H.F.; KNIGHT, A.R.; Woodruff, G.N. MK-801 labels a site on the *N*-methyl-D-aspartate receptor channel complex in rat brain membranes. **J. Neurochem.**, v.50, p. 274–281, 1988.

WONG, G.; BOET, R.; POON, W.; CHAN, M.; GIN, T.; ZEE, B. Intravenous magnesium sulphate for aneurismal subarachnoid hemorrhage: an updated systemic review and meta-analysis. **Critical Care**, v. 15, p.52, 2011.

WU, L.J.; TOYODA, H.; ZHAO, M.G. Upregulation of forebrain NMDA NR2B receptors contributes to behavioral sensitization after inflammation. **J. Neurosci.**, v. 25, n.48, p.11107–11116, 2005.

XIAO, W.H.; BENNETT, G.J. Magnesium suppresses neuropathic pain responses in rats via a spinal site of action. **Brain Res.**, v.666, p.168–172, 1994.

YAILLEN DM, SHAPIRO PA, LUSCHEI ES, FELDMAN GR. Temporomandibular joint meniscectomy—Effect on joint structure and masticatory function in *Macaca fascicularis*. **J Oral Maxillofac Surg.**, v. 46, n. 07, p.255–230, 1979.

YANG, Z.; WANG, Y.; LUO, W.; HUA, X.; WAMALWA, P.; WANG, J.; ZHAO, Z.; LU, Y.; LIAO, Z.; LAI, W. Trigeminal Expression of N-Methyl-D-Aspartate Receptor Subunit 1 and Behavior Responses to Experimental Tooth Movement in Rats. **Angle Orthodontist**, v.79, n.5, 2009.

YU, X-M; HU, J.W.; Sessle, B.J. Effects of inflammatory irritant application to the rat temporomandibular joint on jaw and neck muscle activity. **Pain**, v.60, p.143–149, 1995.

YUN, L.; JUNTIAN, Z. Recent development in NMDA receptors. **Chinese medical journal**, v.113, n.10, p. 948-956, 2000.

ZAMMA, T. Adjuvant-induced arthritis in the temporomandibular joint of rats. **Infect Immun.**, v.39, p.1291-1295, 1983.

ZHANG, W.; SHI, C.; GU, X.; ZHENG-LIANG, M.; ZHU, W. Ifenprodil Induced Antinociception and Decreased the Expression of NR2B Subunits in the Dorsal Horn After Chronic Dorsal Root Ganglia Compression in Rats. **Anesthesia & Analgesia**, v. 108, n.3, 2009.

