



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU*
DOUTORADO EM CIÊNCIAS MÉDICO-CIRÚRGICAS

ALINE BARBOSA TEIXEIRA MARTINS

**EFEITO ANTINOCEPTIVO DA FOTOBIMODULAÇÃO E DA
METFORMINA NA DOR OROFACIAL PÓS-CIRÚRGICA DE RATAS
OVARIECTOMIZADAS**

FORTALEZA

2019

ALINE BARBOSA TEIXEIRA MARTINS

**EFEITO ANTINOCEPTIVO DA FOTOBIMODULAÇÃO E DA
METFORMINA NA DOR OROFACIAL PÓS-CIRÚRGICA DE RATAS
OVARIECTOMIZADAS**

Tese apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médico-Cirúrgicas do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Médico-Cirúrgicas.

Área de Concentração: Inflamação e estresse oxidativo.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Botelho Guimarães

Coorientador: Prof^a Dra. Adriana Rolim Campos Barros

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M341e Martins, Aline Barbosa Teixeira.
EFEITO ANTINOCEPTIVO DA FOTOBIMODULAÇÃO E DA METFORMINA NA DOR
OROFACIAL PÓS-CIRÚRGICA DE RATAS OVARIETOMIZADAS / Aline Barbosa Teixeira Martins. –
2019.
108 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação
em Ciências Médico-Cirúrgicas, Fortaleza, 2019.

Orientação: Prof. Dr. Sérgio Botelho Guimarães.

Coorientação: Prof. Dr. Adriana Rolim Campos Barros .

1. Dor orofacial. 2. Antinocicepção. 3. Hipoestrogenismo. 4. Terapiaa laser de baixa potência. 5.
Metformina. I. Título.

CDD 617

ALINE BARBOSA TEIXEIRA MARTINS

EFEITO ANTINOCEPTIVO DA FOTOBIMODULAÇÃO E DA METFORMINA
NA DOR OROFACIAL PÓS-CIRÚRGICA DE RATAS OVARIECTOMIZADAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Cirurgia como requisito parcial para a obtenção de título de Doutor em Ciências Médico-Cirúrgicas. Área de concentração: Inflamação e estresse oxidativo.

Aprovado em: ____ / ____ / ____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Sérgio Botelho Guimarães – Orientador
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dra. Maria Angelina da Silva Medeiros – Examinadora
Universidade de Fortaleza - UNIFOR

Prof.^a Dr.^a Mariana Lima Vale - Examinadora
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof.^a Dr.^a Gerlania de Oliveira Leite - Examinadora
Universidade de Fortaleza - UNIFOR

Prof.^a Dr.^a Wellyda Rocha Aguiar Galvão - Examinador
Universidade de Fortaleza - UNIFOR

Às minhas filhas, Lara e Julia, que são para mim, o meu maior tesouro e o meu maior incentivo a cada dia. Por elas, e para elas todos os desafios e obstáculos são superados. Na certeza, de que a busca pelo conhecimento é sempre o melhor caminho, e que sou instrumento de amor e também de motivação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, o dom da vida. Sem Ti, faltaria fé e forças, muitas vezes, para continuar. Em tantos momentos de dificuldade, de provações foi a Ti que rezei e pedi que me ajudasse a seguir sempre em frente. E foi em Ti, que sempre encontrei um grande afago e porto seguro.

Às minhas filhas, Lara e Julia, por serem meu maior motivo para me superar e buscar sempre o melhor para nossa família. Ao meu amor, meu marido, meu companheiro, meu amigo, meu cúmplice, José Carlos, que aguentou tantos momentos de estresse, ausência, cansaço e mesmo assim esteve ao meu lado, me apoiando, dando palavras de incentivo, uma mão amiga, um “carão”, muitas vezes, necessários para me motivar a seguir em frente. À ele que esteve sempre ao lado das nossas meninas em todos os momentos. Amo vocês infinitamente!

Aos meus pais, Roberto e Sandra, minha base, meu Porto seguro, meus exemplos de trabalho e honestidade. Obrigada por todo o apoio e investimento em mim, desde sempre. Aos meus irmãos, André e Lucas, por torcerem por mim! Amo vocês imensamente!

À minha querida vizinha Julia (in memoriam), meu exemplo de fé e de mulher forte, corajosa, de garra.

Ao meu orientador, Dr. Sérgio Botelho, por ter confiado em mim e por todos os ensinamentos.

À minha querida co-orientadora, Dra. Adriana Rolim, que foi um verdadeiro anjo em minha vida. Sem palavras para agradecer tudo o que ela tem feito por mim. Me deu a mão quando eu mais precisei e me ajudou em todas as etapas para execução dessa tese. Obrigada profa, nunca conseguirei mensurar o que a Sra tem feito por mim. Minha eterna gratidão.

Se não bastasse um anjo, tive mais vários em meu caminho. Minhas companheiras de pesquisa, que viraram amigas, Gerlânia, Sacha, Angelina, Mayra. Muito grata por todas as manhãs, tardes, noites, feriados de pesquisa e estudo. Vocês são feras!

À profa. Mariana Vale que acreditou em mim e na minha pesquisa, participando ativamente de diversas etapas da pesquisa. Muito obrigada.

À todos os funcionários do NUBEX, que me acolheram tão bem, e disponibilizaram tudo para a realização da pesquisa.

Às queridas, Luciene e Magda, do Programa de Pós Graduação em Ciências Médico-Cirúrgicas por todo o apoio ao longo desses anos.

À Universidade Federal do Ceará, por ter sido uma extensão da minha vida durante o

período no Programa. Quanto orgulho sinto em me tornar Doutora por esta casa.

À Universidade de Fortaleza, o meu sincero muito obrigada! Orgulhosa de trabalhar em uma Universidade tão incrível e que sempre me apoiou a buscar sempre mais. Às minhas amigas de trabalho da UNIFOR que entenderam a minha ausência e correria durante esse período.

Ao NUBEX, da Universidade de Fortaleza, que me acolheu de braços abertos e me possibilitou a coleta de dados da minha pesquisa. Muita gratidão. À todos os docentes e funcionários que fazem parte do NUBEX.

Ao LAFICA por ter me possibilitado coletar dados nesse incrível laboratório. Aos colegas do LAFICA que estiveram na luta de bancada comigo.

À Central Analítica da UFC pela bela parceria com o estudante, possibilitando o uso do microscópio confocal e consequentemente apoiando a ciência no Brasil.

A todos que torceram por mim, direta e indiretamente!

À CAPES pelo apoio financeiro.

“Senhor, obrigada porque até aqui tua mão me guiou, me sustentou [...] que mesmo em meio a lutas, desafios se cheguei até aqui e venci mais este dia, foi por que o teu amor infinito tem sido meu sustento.”

(Samuel 7:12 Bíblia Sagrada)

RESUMO

Dor orofacial é toda e qualquer dor relacionada a tecidos moles e mineralizados da cavidade oral e da face e vêm sendo estudada com relação a uma maior prevalência no sexo feminino, possivelmente em decorrência do caráter hormonal envolvido. Algumas terapias vêm sendo desenvolvidas, como recursos fisioterapêuticos (fotobiomodulação, por exemplo) e o reposicionamento de medicamentos. O estudo teve como objetivo avaliar o efeito antinociceptivo da fotobiomodulação e da metformina na dor orofacial pós-cirúrgica em ratas com hipoestrogenismo. Tratou-se de um estudo experimental realizado com ratas Wistar separadas em 12 grupos (n = 6/cada) em diversas categorias de tratamento. O hipoestrogenismo foi induzido pela ovariectomia bilateral (OVX). As citologias vaginais foram analisadas a fim de observar a fase do ciclo estral de cada rata. Após atingirem o estágio de menopausa, foi realizada a cirurgia de transecção do nervo infraorbital (IONX). Grupos sham e naives foram incluídos (n = 6/cada). Os grupos foram tratados com metformina (MET 250 mg/kg), laser vermelho ou laser infravermelho ou a associação dos recursos durante 14 dias consecutivos. No 10, 30, 50, 70, 100 e 140 pós-operatório, as ratas receberam acetona na vibrissa para avaliar a hipersensibilidade ao frio. O número de *rubbing* faciais foi utilizado como parâmetro de nocicepção. Os animais dos grupos MET, controle, sham e naive tiveram seus tecidos cerebrais coletados e analisados imunohistoquimicamente com reagentes para mTOR e ATF3. A transecção do nervo infraorbital promoveu hipersensibilidade ao frio nas ratas não ovariectomizadas (não-OVX) e ovariectomizadas (OVX) desde o 1º dia pós-operatório até o 7º dia, em comparação aos grupos sham e naive. No 7º dia, as ratas OVX+IONX apresentaram número de maior de comportamentos nociceptivos (**p < 0,01) em relação ao grupo submetido somente à cirurgia IONX. As ratas OVX e não-OVX tratadas com MET, laser vermelho e infravermelho apresentaram menor número de comportamentos nociceptivos, quando comparadas aos grupos Controle OVX e Controle OVX+IONX até o 7º dia pós-operatório. Não houve diferença entre os grupos de ratas OVX e não-OVX tratadas com laser vermelho e infravermelho, exceto no 7º dia pós-operatório quando as ratas OVX diminuíram os comportamentos nociceptivos em relação grupo não-OVX (****p<0,0001). A associação de MET e laser vermelho ou infravermelho prolongou o efeito antinociceptivo até o 10º dia pós-operatório. MET reduziu a imunoexpressão da sinalização de mTOR (**p<0,001) e ATF-3 (*p<0,05) em tronco encefálico e gânglios trigeminiais. Conclui-se que o laser vermelho e o infravermelho apresentam efeito antinociceptivo em ratas normais e ovariectomizadas quando comparadas ao grupo controle, sendo o efeito analgésico foi mais prolongado quando utilizado o laser infravermelho. A metformina apresenta efeito neuroprotetor, levando a um caráter analgésico. Ratas tratadas com metformina associada ao laser vermelho ou infravermelho apresentaram redução do comportamento nociceptivo quando comparados ao grupo controle, sendo esse efeito prolongado quando se usa infravermelho. Não há sobreposição de resultados quando usado a associação de metformina e laser vermelho ou infravermelho.

Descritores: Dor orofacial. Hipoestrogenismo. Antinocicepção. Terapia a Laser de Baixa Potência. Metformina.

ABSTRACT

Orofacial pain is any pain related to soft and mineralized tissues of the oral cavity and face and has been studied in relation to a higher prevalence in females, possibly due to the hormonal character involved. Some therapies are being developed, such as physiotherapeutic resources (photobiomodulation, for example) and drug repositioning. The aim of this study was to evaluate the antinociceptive effect of photobiomodulation and metformin on postoperative orofacial pain in rats with hypoestrogenism. This was an experimental study conducted with Wistar rats separated into 12 groups (n = 6 / each) in different treatment categories. Hypoestrogenism was induced by bilateral ovariectomy (OVX). Vaginal cytologies were analyzed to observe the estrous cycle phase of each rat. After reaching the menopause stage, infraorbital nerve transection (IONX) surgery was performed. Sham and naive groups were included (n = 6 / each). The groups were treated with metformin (MET 250 mg / kg), red laser or infrared laser or resource combination for 14 consecutive days. At 10, 30, 50, 70, 100 and 140 postoperatively, the rats received acetone on the vibrissa to assess cold hypersensitivity. The number of facial rubbing was used as a nociception parameter. MET, control, sham and naive animals had their brain tissues collected and immunohistochemically analyzed with mTOR and ATF3 reagents. Infraorbital nerve transection promoted cold hypersensitivity in non-ovariectomized (non-OVX) and ovariectomized (OVX) rats from the 1st postoperative day until the 7th day, compared to sham and naive groups. On the 7th day, the OVX + IONX rats presented higher number of nociceptive behaviors (** p <0.01) compared to the group submitted to IONX surgery alone. The OVX and non-OVX rats treated with MET, red and infrared laser showed less nociceptive behavior when compared to OVX Control and OVX + IONX Control groups until the 7th postoperative day. There was no difference between the groups of OVX and non-OVX rats treated with red and infrared laser, except on the 7th postoperative day when the OVX rats decreased nociceptive behavior in relation to non-OVX group (**** p <0, 0001). The combination of MET and red or infrared laser prolonged the antinociceptive effect until the 10th postoperative day. MET reduced mTOR (** p <0.001) and ATF-3 (* p <0.05) signaling immunoexpression in brainstem and trigeminal ganglia. It was concluded that the red and infrared laser have antinociceptive effect in normal and ovariectomized rats when compared to the control group, and the analgesic effect was longer when the infrared laser was used. Metformin has a neuroprotective effect, leading to an analgesic character. Rats treated with red or infrared laser metformin showed reduced nociceptive behavior when compared to the control group, and this effect was prolonged when using infrared. There is no overlap of results when using the combination of metformin and red or infrared laser.

Keywords: Orofacial pain. Hypoestrogenism. Antinociception. Low Power Laser Therapy. Metformin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Representação esquemática dos tecidos alvos da dor orofacial.....	18
Figura 2 -	Espécie vegetal <i>Galega officinalis</i>	33
Figura 3 -	Estrutura química da metformina.....	33
Figura 4 -	Representação do espectro eletromagnético e os seus diferentes comprimentos de onda.....	37
Figura 5 -	Representação da curva de absorção dos principais cromóforos absorvidos pelo laser.....	37
Figura 6 -	Efeitos atribuídos à fototerapia com lasers em baixa intensidade.	38
Figura 7 -	Esquema representativo da atuação do laser de baixa potência nos sistemas biológicos para alívio da dor nociceptiva.....	40
Figura 8 -	Modelos para estimulação dos sistemas biológicos pelo laser em baixa potência.....	42
Figura 9 -	Etapas da cirurgia de ovariectomia bilateral (OVX).....	44
Figura 10 -	Metaestro	48
Figura 11 -	Diestro	50
Figura 12 -	Proestro	50
Figura 13 -	Estro.....	50
Figura 14 -	Cirurgia do nervo infraorbital (IONX) (a; b).....	50
Figura 15 -	Representação esquemática do comportamento de <i>rubbing</i> facial	51
Figura 16 -	com as patas dianteiras e traseiras em roedor.....	52
Figura 17 -	Aplicação laser vermelho (660nm).....	53
Figura 18 -	Aplicação laser infravermelho (904nm).....	53
Figura 19 -	Descrição do preparo do animal para perfusão.....	55
Figura 20 -	Acomodação do cérebro no bloqueador cerebral.....	56
Figura 21 -	<i>The Brain bloker</i>	56
Figura 22 -	Lâmina para corte no bloqueador.....	56
Figura 23 -	Fotomicrografia da imunopressão de MTOR no tronco encefálico e gânglios trigeminiais de ratas submetidas a	

	administração de MET.....	57
Figura 24 -	Desenho esquemático para imunoflorescência de glânglio trigemial e tronco encefálico.....	75
	Fotomicrografia da imunoexpressão de ATF-3 no tronco encefálico e gânglios trigeminais, de ratas submetidas a administração de MET.....	77

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Avaliação da nocicepção orofacial neuropática em ratas ovariectomizadas e não ovariectomizadas.....	60
Gráfico 2 -	Avaliação do efeito antinociceptivo orofacial neuropático da metformina em ratas ovariectomizadas e não ovariectomizadas.	61
Gráfico 3 -	Avaliação do efeito antinociceptivo orofacial neuropático do laser vermelho em ratas ovariectomizadas e não ovariectomizadas.....	62
Gráfico 4 -	Avaliação do efeito antinociceptivo orofacial neuropático do laser vermelho em ratas ovariectomizadas e não ovariectomizadas.....	63
Gráfico 5 -	Avaliação do efeito antinociceptivo orofacial neuropático do laser infravermelho em ratas ovariectomizadas e não ovariectomizadas (comparados ao grupo Controle).....	64
Gráfico 6 -	Avaliação do efeito antinociceptivo orofacial neuropático do laser infravermelho em ratas ovariectomizadas e não ovariectomizadas.....	65
Gráfico 7 -	Avaliação do efeito antinociceptivo orofacial neuropático da associação entre metformina e laser vermelho em ratas normais (comparados ao grupo Controle).....	66
Gráfico 8 -	Avaliação do efeito antinociceptivo orofacial neuropático da associação entre metformina e laser vermelho em ratas ovariectomizadas.....	67
Gráfico 9 -	Avaliação do efeito antinociceptivo orofacial neuropático da associação entre metformina e laser vermelho em ratas ovariectomizadas (comparados ao grupo Controle).....	68
Gráfico 10 -	Avaliação do efeito antinociceptivo orofacial neuropático da associação entre metformina e laser infravermelho em ratas normais (comparados ao grupo Controle).....	68
Gráfico 11 -	Avaliação do efeito antinociceptivo orofacial neuropático da	

	associação entre metformina e laser infravermelho em ratas normais.....	67
Gráfico 12 -	Avaliação do efeito antinociceptivo orofacial neuropático da associação entre metformina e laser infravermelho em ratas ovariectomizadas (comparados ao grupo Controle).....	68
Gráfico 13 -	Avaliação do efeito antinociceptivo orofacial neuropático da associação entre metformina e laser infravermelho em ratas ovariectomizadas.....	68
Gráfico 14 -	Comparativo entre os grupos durante o período do experimento	69
Gráfico 15 -	Comparativo entre os grupos durante o período do experimento	69
Gráfico 16 -	Comparativo entre os grupos durante o período do experimento	69
Gráfico 17 -	Comparativo entre os grupos durante o período do experimento	69
Gráfico 18 -	Comparativo entre os grupos durante o período do experimento	69
Gráfico 19 -	Comparativo entre os grupos durante o período do experimento	60
Gráfico 20 -	Análise quantitativa da imuexpressão para mTOR no tronco encefálico, gânglios trigeminais, PAG e tálamo de ratas com dor orofacial submetidas a administração da MET.....	70
Gráfico 21 -	Análise quantitativa da imunoexpressão para ATF-3 no tronco encefálico e gânglios trigeminais de ratas com dor orofacial submetidas a administração da MET.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAOP -	American Board of Orofacial Pain
AMPK -	<i>AMP-Activated Protein Kinase</i>
ANOVA -	Análise de Variância
ATP -	Adenosina Trifosfato
ATF-3 -	Fator de Transcrição Ativado
CCO -	Citocromo C Oxidase
CEUA -	Comitê de Ética em Pesquisa Animal
CONCEA -	Conselho Nacional para o Controle da Experimentação Animal
DC -	Dor Crônica
DOF -	Dor Orofacial
DST -	Desordens Temporomandibulares
DTM -	Disfunção Temporomandibular
EPM -	Erro Padrão da Média
EROs -	Espécies Reativas de Oxigênio
EUA -	Estados Unidos da América
FDA -	<i>Food and Drug Administration</i> / Agência de Medicamentos e Alimentos
HSP -	Proteína do Choque Térmico
IASP -	Associação Internacional para o Estudo da Dor
IHS -	Sociedade Internacional de Cefaléia
IONX -	Nervo Infraorbital
LPS -	Lipopolissacarídeo
NO -	Óxido Nítrico
NT -	Neuralgia do Trigêmio
NUBEX -	Núcleo de Biologia Experimental
OHIP -	<i>Oral Health Impact Profile</i> / Perfil de Impacto da Saúde Oral
OIDP -	<i>Oral Impact on Daily Performances</i>
OVX -	Ovariectomia Bilateral
PBS -	Tampão trifosfato
PSF -	Programa da Saúde da Família
PTTN -	Neuropatia Trigeminal Dolorosa Pós-Traumática
RE -	Retículo Endoplasmático

SC - Santa Catarina
SNC - Sistema Nervoso Central
SP - São Paulo
SPF - *Specific Pathogen Free*
TRPA1 - Potencial Transitório Anquirina 1
UEPG - Universidade Estadual de Ponta Grossa
UFPB - Universidade Federal da Paraíba
UNIARAXÁ - Centro Universitário do Planalto de Araxá
UNIFOR - Universidade de Fortaleza

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
1.1	Dor orofacial.....	18
1.2	Epidemiologia da dor orofacial.....	19
1.2.1	<i>Custos de tratamento e absenteísmo na dor crônica.....</i>	24
1.3	Dor orofacial e dimorfismo sexual: foco na dor orofacial.....	26
1.4	Dor neuropática.....	28
1.4.1	<i>Sintomatologia da dor neuropática.....</i>	28
2	OPÇÕES DE TRATAMENTO PARA DOR OROFACIAL.....	31
2.1	Tratamento medicamentoso.....	32
2.1.1	<i>Anticonvulsivantes e antidepressivos</i>	32
2.1.2	<i>Metformina.....</i>	34
3	FOTOBIMODULAÇÃO.....	36
3.1	Características do laser de baixa potência.....	36
3.2	Interação da luz com os tecidos biológicos.....	38
3.3	Efeitos terapêuticos do laser de baixa potência.....	39
3.3.1	<i>Processo de reparo.....</i>	40
3.3.2	<i>Mecanismos anti-inflamatórios e analgésicos do laser terapêutico....</i>	40
3.5	Tipos de lasers.....	43
3.5.1	<i>Laser vermelho X Laser infravermelho.....</i>	43
4	JUSTIFICATIVA.....	44
5	OBJETIVOS.....	45
5.1	Geral.....	45
5.2	Específicos.....	45
6	MÉTODOS.....	46
6.1	Animais.....	46
6.2	Grupos experimentais	46
6.3	Indução do hipoestrogenismo.....	47
6.4	Avaliação do ciclo estral.....	48
6.5	Nociceção orofacial neuropática induzida pela transecção do nervo infraorbital (IONX).....	50
6.6	Avaliação da hipersensibilidade ao frio.....	51

6.7	Aplicação do <i>laser</i> terapêutico.....	52
6.8	Avaliação da expressão de mTOR e ATF-3 e co-marcação de neurônio através da marcação de NeuN.....	53
6.8.1	<i>Perfusão cardíaca com uso de Paraformaldeído (PFA)</i>	53
6.8.2	<i>Extração dos núcleos espinhais trigeminais (SP5C), gânglio trigeminal</i>	55
6.8.3	<i>Preparo das lâminas com uso do criostato</i>	56
6.8.4	<i>Imunoflorescência de tecido extraído do trato espinhal do trigêmeo, do gânglio trigeminal</i>	57
6.9	Análise estatística.....	58
7	RESULTADOS	60
7.1	Avaliação da nocicepção orofacial neuropática em ratas ovariectomizadas e não ovariectomizadas	60
7.2	Avaliação do efeito antinociceptivo orofacial neuropático da metformina em ratas normais e ovariectomizadas	61
7.3	Avaliação do efeito antinociceptivo orofacial neuropático do laser em ratas normais e ovariectomizadas	62
7.4	Avaliação do efeito antinociceptivo orofacial neuropático do laser infravermelho em ratas normais e ovariectomizadas	64
7.5	Avaliação do efeito antinociceptivo orofacial neuropático da associação entre metformina e laser vermelho em ratas normais e ratas ovariectomizadas	66
7.6	Avaliação do efeito antinociceptivo orofacial neuropático da associação entre metformina e laser infravermelho em ratas normais e ratas ovariectomizadas	69
7.7	Avaliação ponderal das ratas	73
7.8	Imunoflorescência para mTOR em tronco encefálico e gânglios trigeminais de ratas com dor orofacial	74
7.9	Imunoflorescência para ATF-3 em tronco encefálico e gânglios trigeminais de ratas com dor orofacial	76
	DISCUSSÃO	78
8	Relação do efeito nociceptivo orofacial em ratas ovariectomizadas e normais	78
8.1	ovariectomizadas e normais	78

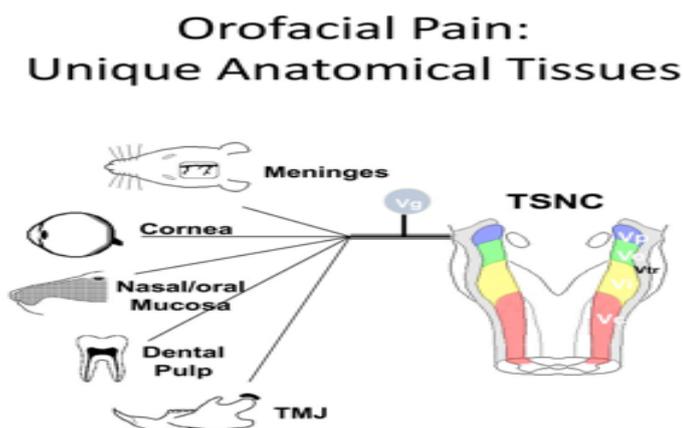
	Efeito antinociceptivo orofacial neuropático da metformina.....	80
8.2	Avaliação do efeito antinociceptivo orofacial neuropático da fotobiomodulação (laser vermelho e infravermelho).....	82
8.3	Avaliação do efeito antinociceptivo orofacial neuropático da metformina associada a fotobiomodulação.....	8
8.4	CONCLUSÃO.....	86
	REFERÊNCIAS.....	87

1 INTRODUÇÃO

1.1 Dor orofacial

Dor orofacial é toda e qualquer dor relacionada a tecidos moles e mineralizados (pele, vasos sanguíneos, ossos, dentes, glândulas ou músculos) da cavidade oral e da face, sendo, por conseguinte, derivada de vários tecidos alvos como as meninges, a córnea, as mucosas oral/nasal, a polpa do dente e a articulação temporomandibular (Figura 1) (CARRARA; CONTI; BARBOSA, 2010; HARGREAVES, 2011).

Figura 1. Representação esquemática dos tecidos alvos da dor orofacial (TSNC: complexo nuclear sensorial trigeminal, Vg: gânglio trigeminal, TMJ: articulação temporomandibular; Vp: principal; VO: oralis; Vi: unipolaris; Vc: caudalis).



Fonte: Carrara; Conti; Barbosa (2010); Hargreaves (2011).

A dor orofacial está ligada a um conjunto de transtornos, incluindo desordens temporomandibulares (DTMs), cefaleias, nevralgias, odontalgias e dor idiopática (AGOSTONI; FRIGERIO; SANTORO, 2005).

Possui um elevado predomínio na população, apresentando sinais e sintomas em até 86% da população ocidental, ocorrendo principalmente na faixa etária de 13 a 35 anos, sendo quatro vezes mais presente em mulheres do que em homens, estando ligada à sofrimento para os pacientes. Comprometem significativamente as atividades cotidianas e a realização das atividades profissionais, o que gera impacto negativo na economia e nos gastos em saúde (BASTOS; GIGANTE; PERES, 2008).

1.2 Epidemiologia da dor orofacial

A dor atualmente é considerada um grave problema na sociedade moderna. Sua prevalência é ascendente e simboliza hoje a principal causa de procura por assistência à saúde sendo, dessa forma, apontada como um preocupante caso de saúde pública (SCHAPPERT; BURT, 2006).

Segundo Teixeira *et al.* (2012) as pesquisas relacionadas sobre a epidemiologia da dor ainda são obscuras em decorrência da variedade da apresentação, mudanças sazonais, regionais e inexistência de regulamentação de catalogação das afecções álgicas.

Mesmo se tratando de um caso de Saúde Pública e acarretando graves prejuízos pessoais e de caráter econômicos, pouco se sabe ainda sobre a epidemiologia, natureza e os prejuízos advindos da dor crônica em crianças, adultos e idosos brasileiros. Os estudos sobre o tema são escassos, e quando encontrados, geralmente, referem-se a dores específicas (BASTOS; ALMEIDA FILHO; SANTANA, 1993; KRELING; DA CRUZ; PIMENTA, 2006).

Macedo (2004) afirma que a prevalência de dor na população é de cerca de 1,9 bilhões de indivíduos mundialmente e cerca de 50 milhões de pessoas no Brasil. De acordo com dados da *Global Industry Analyst* (2011) esses dados são em torno de 1,5 bilhões de pessoas no mundo acometidos por algum tipo de dor.

Dellaroza; Pimenta; Matsuo (2007) afirmam que a estimativa é de que 7 a 40% da população mundial sofra de dor crônica, neste contexto, a dor tem um dramático efeito na sociedade do ponto de vista social, econômico e pessoal.

Ruviaró e Filippin (2012) complementam que a suposição de dor crônica (DC) afeta em torno de 30 e 40% da população brasileira, vindo a ser o motivo preponderante de absenteísmo, licenças médicas, aposentadoria precoce, indenizações trabalhistas e baixa produtividade.

No que diz respeito à dor orofacial Lipton, Ship e Larach-Robinson (1993) complementam que estas são prevalentes na população geral, chegando a atingir 12% das amostras estudadas, percentual semelhante ao da dor torácica, ficando atrás das

lombalgias (41%), cefaleias (26%) e dores abdominais (17%). Outros estudos mostram que 22% da população americana referiu algum tipo de dor orofacial nos seis meses antes da pesquisa.

Kohlman (2002) apreciou a prevalência de dor orofacial (DOF) nos habitantes da Alemanha, em uma amostragem constituída por 7.124 indivíduos, através da avaliação de elementos obtidos pelo *The German National Health Survey* e outros estudos típicos de outras regiões do país, que proveram repercussões sobre a prevalência de DOF em relação a gênero e idade. O estudo notificou uma prevalência de 16% de DOF no último ano, e de 7% nos últimos 7 dias, sendo as mulheres mais impactadas que os homens. O estudo consumou que a qualidade de vida dos portadores de DOF, mensurada pelo questionário SF-36, pode ser vigorosamente abalada por esta circunstância dolorosa.

Em outra pesquisa desenvolvida no Reino Unido por Macfarlane *et al.* (2002) com o intuito de verificar a prevalência de DOF na população e em subgrupos populacionais, notificou-se 2.504 indivíduos de 18 a 65 anos de idade apresentavam várias condições de dor durante o mês que antecedeu a pesquisa (dor na articulação, ao redor dos olhos, à frente dos ouvidos, nas têmporas e sensibilidade muscular) e características em relação ao tempo, frequência e duração dos episódios de dor. A frequência das queixas foi superior em mulheres e, para ambos os sexos, a maior taxa de prevalência foi descrita entre as idades de 18 a 25 anos de idade, e, a menor, no intervalo entre 56 a 65 anos. Somente 46% das pessoas que relataram dor buscaram assistência médica e 17% precisaram se retirar do trabalho ou não conseguiram realizar as atividades normais por causa da dor.

A grande parte das pesquisas feitas sobre a prevalência da DOF concentraram-se, principalmente, em populações caucasianas. Portanto, um estudo de base populacional, desenvolvido com a na população adulta de Hong Kong, China que mensurou a presença de vários tipos de dor (dor articular, dor odontogênica, dor facial e ardência bucal), e características como frequência, intensidade e duração nas quatro semanas que antecederam a pesquisa, avaliou 1.222 pessoas acima dos 18 anos de idade e constatou que 41,6% dos entrevistados informaram a presença de algum sintoma de DOF, estando de acordo com os achados de países ocidentais (McMILLAN *et al.*, 2006).

Diversos estudos foram desenvolvidos no Brasil, com as mais diferentes populações a fim de avaliar a prevalência de dor orofacial. Michel-Crosato *et al.* (2006) entrevistaram 401 trabalhadores de um frigorífico da Região Sul do Brasil com objetivo de mensurar a repercussão da situação bucal na qualidade de vida; 73,10% dos trabalhadores questionados afirmaram ter apresentado dor de dente provocada, dor de dente espontânea ou queimação de língua nos seis meses anteriores, tendo maior proporção de dor leve e moderada. O trabalho encontrou correlação entre DOF e qualidade de vida, de modo que 29,4% das pessoas que referiram dor, apresentaram contratempo para limpar os dentes e 25,4% relataram dificuldade para se alimentar.

Leung, McMillan e Wong (2008) realizaram uma pesquisa com indivíduos adultos de Hong Kong em que avaliaram 1.352 pessoas acerca de sintomas relacionados a DOF correntemente episódicas ou presentes há seis meses e notificaram uma prevalência de 57% de dor corrente ou episódica, e apenas 13,2% de dor presente há seis meses, sendo a dor de dente o sintoma mais comum, relatado por 42,2% das pessoas que referiram dor. Inclui também nos achados que, mesmo a DOF apresentando uma severidade devido a sua forte intensidade, o impacto psicossocial foi pequeno, fato que pode estar associado a estratégias mais eficazes de enfrentamento da dor nesta cultura.

Outro estudo realizado por Lacerda, Traebert e Zambenedetti (2008) a fim de verificar a prevalência de dor orofacial e sua relação com absenteísmo em trabalhadores do setor metalúrgico e mecânico do município de Xanxerê, Santa Catarina notificou que todos os trabalhadores eram do sexo masculino (n = 480) das 13 indústrias do setor na cidade e que a prevalência de dor orofacial foi de 66,1%, sendo dor de dente provocada ou dor de dente espontânea os tipos mais comuns.

Em pesquisa desenvolvida por Lacerda *et al.* (2011) com 267 trabalhadores de uma indústria têxtil em Laguna/SC obtiveram que a prevalência de DOF experimentada pelo grupo nos últimos seis meses foi de 32,2% e o impacto oral no desempenho diário foi de 28,5%, sendo as atividades mais afetadas: comer e apreciar comida, e higienizar os dentes e a boca.

No que diz respeito a prevalência de dor orofacial em universitários, Medeiros, Batista e Forte (2011) aplicaram um questionário com 347 estudantes de graduação do primeiro e último ano dos cursos de Odontologia, Medicina, Farmácia, Fisioterapia e

Enfermagem em João Pessoa, da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) obtiveram que a maioria dos estudantes apresentaram disfunção leve (54,5%), e apenas 2,6% disfunção severa. Os hábitos parafuncionais mais frequentes foram colocar a mão no queixo (36,31%) e dormir de um lado (32,27%).

Na pesquisa desenvolvida por Ferreira *et al.* (2012) com 153 estudantes de Odontologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) de todos os períodos, com idades entre 17 e 25 anos verificou-se que 39% dos graduandos apresentaram algum tipo de Disfunção Temporomandibular (DTM), sendo que 73% eram do gênero feminino. Foi observada uma porcentagem de 93% de desordens articulares e 7% de desordens musculares, tendo sido 78% isoladas e 22% associadas. A DTM articular mais prevalente, independente do gênero, foi o deslocamento do disco com redução de 68%.

Custódio *et al.* (2017) a fim de notificar a ocorrência de DTM em estudantes do primeiro e do último ano de cursos de Educação Física, Enfermagem e Fisioterapia do Centro Universitário do Planalto de Araxá (UNIARAXÁ), totalizando 114 alunos, verificou-se prevalência de DTM leve em 78% dos participantes.

Em uma pesquisa realizada por Silva *et al.* (2012) em Ribeirão Preto (SP) com 99 pessoas do sexo masculino, na faixa etária de 18 a 66 anos de idade, por meio da aplicação do *Oral Impact on Daily Performances* (OIDP), que mensurou, nos seis meses anteriores à pesquisa, vivência de dor na boca, dentes ou próteses e como estas podem repercutir na atividade diária. Das pessoas entrevistadas, 56,6% referiram DOF nos últimos seis meses, sendo assim considerada uma alta prevalência e seu efeito negativo na vida das pessoas.

Siqueira *et al.* (2013) em sua pesquisa, averiguou a ocorrência de cefaleia e DOF em adultos e idosos da cidade de Ermelino Matarazzo, São Paulo. Foram questionados 505 adultos de 18 a 59 anos de idade e 385 idosos acima dos 60 anos e verificou-se que 55,5% afirmaram possuir algum tipo de DOF, sendo a dor de cabeça a mais preponderante (41,1%), seguida da dor de dente (10,2%), dor facial (7,7%) e dor na língua (0,7%). A pesquisa ainda achou correlação entre a prevalência de dor e a existência de distúrbios do sono e pior qualidade de vida, sendo que 48,6% dos adultos e 58,7% dos idosos relataram alguma perda das atividades diárias devido à dor, evidenciando assim, a repercussão das condições dolorosas sobre a qualidade de vida

desses indivíduos.

Cavalcanti *et al.* (2015) em pesquisa com idosos não institucionalizados, com idades iguais ou superiores a 60 anos, cadastrados no Programa da Saúde da Família (PSF) do município de Areia, Paraíba, Brasil verificou-se uma prevalência de DTM no grupo estudado foi de 46,5%.

Os estudos epidemiológicos brasileiros sobre dor crônica, inclusive orofacial, ainda são deficientes, portanto, alguns achados mostram a alta prevalência desses casos e a comum associação entre eles em um mesmo indivíduo. Esses achados são insignificativos para a compreensão da dor orofacial no Brasil e para determinar estratégias de controle e combate a dor em nossa população (CARRARA; CONTI; BARBOSA, 2010).

Outra modalidade de dor é a dor pós-operatória. De acordo com Haggman-Henrikson, Rezvani, List (2014); Khan *et al.* (2019) algum tipo de trauma ou lesão na região dentária e tecidos adjacentes, assim como lesões na cabeça e no pescoço podem induzir a dor em caráter imediato ou a longo prazo em algumas regiões, como os músculos mastigatórios, a coluna cervical, articulação temporomandibular, articulações e coluna vertebral.

Sessle (2000) afirma que existe uma relação de dor pós-operatória e dor mandibular e que esta ocorre em 75% dos pacientes, mostrando que há mecanismos fisiológicos envolvidos na propagação da dor na região trigeminal, fundamentando presença dor mandibular muscular associada, em diversos músculos, como temporal e masseter. Essa dor muscular, por sua vez, possui caráter difuso, levando a uma sensibilização central, podendo ser resistente e com causas diversas.

Jääskeläinen (2004); Siqueira *et al.* (2006) complementaram que processos cirúrgicos afetam bastante a sensibilidade da região mandibular, sendo notável conduzir e mensurar essas anormalidades, visto que podem evoluir para dor neuropática.

A sensibilização periférica ocorre por liberação de mediadores inflamatórios que são lançados em consequência à um trauma, que irão estimular nociceptores e impulsionar a atividade neuronal (TAL; ELIAV, 1996; ELIAV *et al.*, 1999).

Em caso de lesão nervosa ocorre indução da expressão de neuropeptídeo no

gânglio trigeminal, induzindo a alteração nervosa, como por exemplo em fibras A β e células gliais no SNC, importantes na iniciação e manutenção da dor crônica. Há relação com diversos neurotransmissores, podendo desprender moléculas excitatórias como as citocinas pró-inflamatórias e glutamato em consequência à neuro-sinais internos (SALTER, BEGGS, 2014; PENG *et al.*, 2016).

1.2.1 Custos de tratamento e absenteísmo na dor crônica

A dor crônica é vista como um caso de saúde pública e gera graves danos pessoais e socioeconômicos (VON KORFF; DWORKIN; LE RESCHE, 1990).

Para Rossetto *et al.* (1999) é inadiável a necessidade de estimar sua grandeza e dimensionar sua despesa para a sociedade, investigar as transformações nas relações interpessoais, a limitações dos papéis sociais, como restrições nas atividades de trabalho, na convivência familiar e na vida social, buscando qualificar a demanda por ações de saúde.

Sternbach (1986) realizou um estudo com 1.254 indivíduos nos Estados Unidos a fim de verificar a prevalência e seriedade dos diferentes tipos de dor, os atributos demográficos daqueles com dor, o impacto da dor no trabalho e outras atividades, a associação entre dor e mecanismos de estresse, a procura por médicos e demais profissionais da saúde no tratamento da dor, e o êxito de diversos tratamentos para o manejo da dor. Obteve-se que 500 milhões de dias de trabalho foram perdidos devido à dor entre os indivíduos empregados.

Em outro estudo, conduzido por Seers (1992) mostrou que a dor lombar é incumbida por uma perda de 1.400 dias de trabalho por mil habitantes por ano, o que revela um grande custo médico e social. Nos Estados Unidos, o custo da dor crônica foi mensurado em 40 bilhões de dólares, sendo a dor crônica o fator mais usual de limitação em pessoas até 45 anos e a segunda razão de consulta médica.

Segundo Teixeira *et al.* (1995) no Brasil, em pesquisa desenvolvida com indivíduos com dor crônica, achou-se que 94,9% possuía algum tipo de comprometimento da atividade profissional, como queda do desempenho e absenteísmo ao trabalho.

Rossetto *et al.* (1999) complementa que se estima que 50% das consultas

médicas possuem associação com a dor crônica e que 50% dos doentes que possuem podem ter algum tipo de incapacitação gerada pela dor. Os resultados sociais da dor crônica e a relevância de estratégias para sua minimização e tratamento foram comprovadas através do risco relativo de mortalidade referente à ocorrência de dor crônica.

De acordo com Rotta *et al.* (1985) um estudo brasileiro que avaliou dores múltiplas em indivíduos vinculados aos consultórios e às clínicas médicas para a caracterização da dor encontrou que técnica de amostragem concluiu que o estudo não possibilita representação da dor crônica na população geral.

Melo, Ribeiro e Storpirtis (2006) afirmam que o crescimento da eficiência na prevenção e no tratamento de doenças resultou no prolongamento da expectativa de vida.

Os custos são classificados como diretos, indiretos e intangíveis. Os custos diretos são em relação aos cuidados médicos e medicamentos, enquanto os indiretos são associados pela ausência de capacidade produtiva dos pacientes em decorrência da morbidade ou mortalidade. Os intangíveis, por sua vez, são relacionados à dor e ao sofrimento, de modo a serem os mais difíceis de quantificar e avaliar, visto que interferem na qualidade de vida dos indivíduos (ROBERTSON; LANG; HILL, 2003; LESSARD; CONTANDRIOPOULOS; BEAULIEU, 2009).

Vlainich *et al.* (2010) afirmam que os custos mensais médios dos medicamentos para tratamento ambulatorial da dor crônica são em média de R\$127,74, mostrando que os custos de medicamentos não diferem de forma significativa, levando-se em conta o tipo de dor envolvida.

1.3 Dor orofacial e dimorfismo sexual

Há bastante tempo que estudos diferenciando homens e mulheres em relação à prevalência da dor e da busca de tratamento médico em condições dolorosas, como também no comportamento em resposta à dor e aos tratamentos vem sendo realizados. Os motivos são bem diversos, sejam por questões biológicas, sejam diferenças genéticas ou hormonais, e pontos psicossociais, caracterizadas por fatores experienciais e socioculturais, assim, como o limiar de dor e a tolerância aos

tratamentos associados (HURLEY; ADAM, 2008; MOGIL, 2012; TORGRIMSON; MINSON, 2005).

Filligim; Gear (2004); Gaumond; Arsenault; Marchand (2005); Thompson *et al.* (2008); Hagiwara (2010) demonstraram que essa possibilidade é apoiada por diversos achados em estudos realizados com animais e Berkley (1997); Filligim e Gear (2004) em humanos. No entanto, as diferenças precisas, bem como sua magnitude, ainda não estão bem esclarecidas.

Macfarlane, Glenny e Worthington (2001) realizaram uma revisão sistemática em que tratava da relação do gênero e idade. A prevalência de todos os tipos de DOF foi mais afirmada em mulheres. A dor odontogênica, feridas intra-orais e a dor articular decresceram com a idade, no entanto a taxa de prevalência de ardência bucal cresceu com aumento da idade e a dor facial manteve-se constante. Notificou-se também a presença de uma relação entre idade, gênero e fatores psicológicos e a DOF, ressaltando dessa forma, a indispensabilidade de se realizar pesquisas epidemiológicas de qualidade na população geral, com amostras apropriadas para a definição exata da prevalência e detecção de significativos aspectos concatenados.

De acordo com a *American Board of Orofacial Pain* (AAOP) (2008) e Bettoni *et al.* (2008) as mulheres apresentam prevalência significativamente maior de dor que os homens com idades similares e que segundo Conti *et al.* (2012) e Blanco-Aguilera *et al.* (2013) os fatores biológicos e culturais fundamentam tais dessemelhanças sexuais. A influência sexual na ocorrência de dor reduz-se nas idades mais avançadas. Predomina nas mulheres e em indivíduos deprimidos. Prevalecem mais em mulheres, em indivíduos com idades de 55 a 64 anos e em mais idosos.

Figueiredo *et al.* (2009) complementa que os indivíduos que mais buscam atendimentos para disfunção temporomandibular (DTM) são mulheres com idades entre 20 e 40 anos e que as principais queixas aferidas são dor articular e dor muscular. Porém as queixas mais prevalentes são o ruído, a dor articular e a ocorrência de cefaleia.

A localização da dor de acordo com as partes do corpo também pode amplificar essa diferença relacionada ao sexo, porque essa discrepância é mais pronunciada no caso da dor craniofacial, mais comum em mulheres. Além disso, mais mulheres do que homens sofrem de neuralgia do trigêmeo. Estes dados indicam que os hormônios

sexuais podem influenciar o desenvolvimento de condições de dor no trigêmeo (KATUSIC *et al.*, 1990; SACCO; TANAKA, 2008; MÜLLER *et al.*, 2011; FEJES-SZABÓ *et al.*, 2018).

No que diz respeito as questões hormonais, uma fase importante vivenciada pelas mulheres é o climatério, que vem do grego *Klimacter* e significa período crítico. O climatério é um período compreendido na vida da mulher em que ocorre a transição do período reprodutivo ao não-reprodutivo (FERNANDES; BACARAT; LIMA, 2004).

O Ministério da Saúde afirma que este período ocorre entre 40 e 65 anos de idade, sendo dividido em: pré-menopausa, quando inicia após os 40 anos, levando a redução da fertilidade em mulheres com ciclos menstruais regulares ou com padrão menstrual similar ao ocorrido durante a vida reprodutiva; perimenopausa, o qual inicia dois anos antes da última menstruação e vai até um ano após (apresenta ciclos menstruais irregulares e alterações endócrinas); pós-menopausa, em que começa um ano após o último período menstrual (BRASIL, 2008).

Trata-se de uma etapa de extrema importância na vida da mulher, visto que ocorre uma redução gradual da produção de hormônios sexuais femininos a partir dos ovários. Sendo assim, leva a diversos sinais e sintomas desagradáveis, conhecidos como síndrome do climatério, além de patologias comuns nessa fase, como osteoporose e doenças cardiovasculares. A maioria dos sintomas típicos do climatério são decorrentes da redução dos níveis de estrogênio, em que os mais comuns são a instabilidade vasomotora, distúrbios menstruais, sintomas psicológicos, atrofia genitourinária, presença de casos de alodinia em maiores proporções e, posteriormente osteoporose e alterações cardiocirculatórias (FERNANDES; BACARAT; LIMA, 2004; MOREIRA, 2014).

Moreira (2014) complementa que esse tipo de sintomas psíquicos e vasomotores, típicos do período menopáusico e pós-menopausal, se devem ao hipoestrogenismo em consequência da disfunção ovariana na mulher.

1.4 Dor neuropática

A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) vem debatendo acerca da nomenclatura da Neuropatia Trigeminal Dolorosa Pós-Traumática (PTTN), idealizada pela Sociedade Internacional de Cefaléia (IHS). Esse termo traduz as dores de origem neuropática que interferem no nervo trigêmeo e estão localizadas na região da cabeça, face e cavidade oral. Essa nova nomenclatura vem substituindo termos como, dor por desafereção, neuropatia traumática, dor fantasma (WODA *et al.*, 2005; MELIS; SECCI, 2007; BAAD-HANSEN, 2008; ZAGURY *et al.*, 2011; BENOLIEL *et al.*, 2012; BAAD-HANSEN *et al.*, 2013).

A dor neuropática é caracterizada por lesões de nervos ou que envolva o sistema somatosensor, e normalmente acomete as fibras nervosas periféricas. Os mecanismos moleculares envolvidos na dor neuropática são complexos e apresentam comprometimento da expressão gênica de canais iônicos comuns, receptores, neuropeptídeos e enzimas (MOSS *et al.*, 2008; BASBAUM *et al.*, 2009; COSTIGAN; SCHOLZ; WOOLF, 2009; CHRISTOPH *et al.*, 2011; JONGEM *et al.*, 2014).

Como exemplo de dor neuropática, tem-se a neuralgia do trigêmeo (NT), estando localizada na face, podendo ser encontrados sintomas faciais dolorosos intensos e espasmos no período de exacerbação da doença (RUDOLPH, 2008).

A incidência anual da NT é de 4,3 para cada 100.000 habitantes, sendo mais prevalente no gênero feminino e em 90% dos casos afeta pessoas acima de 40 anos de idade (RUDOLPH, 2008; ZAGURY *et al.*, 2011; PENNARROCHA *et al.*, 2012; PESCHILLO; DELFINI, 2012; BAAD-HANSEN *et al.*, 2013; EL-TALLAWY *et al.*, 2013; PIGG *et al.*, 2013; SIQUEIRA *et al.*, 2013).

1.4.1 Sintomatologia da dor neuropática de caráter pós traumática

Acontece caracteristicamente no ponto alvo do trauma, ou no dermatômo distal do nervo afetado. Em casos de traumas em segmentos nervosos mais extensos, pode ocorrer alodinia grave (WODA *et al.*, 2005; RENTON; YILMAZ, 2011; BENOLIEL *et al.*, 2012).

De acordo com Haanpdd *et al.* (2001) a alodinia é um sintoma comum em

indivíduos que apresentam dor devido a uma doença ou lesões no sistema nervoso, dentre elas a dor orofacial de caráter neuropático. É caracterizada por dor decorrente de um estímulo que frequentemente não causa dor, sendo manifestada em locais com área de inervação da estrutura nervosa lesionada ou afetada por doença, podendo, no entanto, ocasionalmente, extravasar a mesma. Normalmente, tem um início precoce e pode regredir com o tempo após uma lesão aguda, mas também pode aumentar com o tempo e evoluir para condições de dor neuropática de progressão lenta. A hipersensibilidade precoce pode aumentar a probabilidade de dor neuropática persistente.

A alodinia pode ser classificada em função da modalidade sensorial que provoca a dor, ou seja, térmica (frio ou calor) ou mecânica (toque dinâmico, picada de agulha e pressão). A alodinia mecânica é decorrente de uma dor provocada por um leve toque na pele; a alodinia de pressão (estática e profunda) é provocada por pressão colocadas na pele e no tecido profundo; a alodinia ao estímulo de picada de agulha são em vista ao estímulo por agulha ou monofilamento e a alodinia ao frio e ao calor são provocadas por estímulos frios ou quentes aplicados na pele (JENSEN; FINNERUP, 2014).

A hiperalgesia e outras mudanças sensoriais podem ser decorrentes de alterações mais expressivas no desencadeamento somatossensorial central (LIST; LEIJON; SVENSSON, 2008; BAAD-HANSEN *et al.*, 2013).

A PTTN apresenta dor de caráter unilateral podendo haver acometimento do sistema nervoso central em casos mais específicos quando apresenta característica mais difusa, porém raramente atravessa a linha média (JÄÄSKELÄINEN, 2004; WODA *et al.*, 2005; BENOLIEL *et al.*, 2012).

Pode – se apresentar diariamente, ou não, não havendo predileção de dias e horários, com intensidade moderada a forte, dor em queimação, e podendo queixar-se de edema, corpo estranho, calor ou frio, vermelhidão ou rubor local (WODA *et al.*, 2005; BAAD-HANSEN *et al.*, 2008; BAAD-HANSEN *et al.*, 2013; RENTON; YILMAZ, 2011; DAGSDOTTIR *et al.*, 2016).

Ocorre ainda, nesse tipo de patologia, questões psicossociais bem claras e aqueles indivíduos com dor mais grave, normalmente possuem casos altos de depressão e exacerbação da dor, assim como queda da qualidade de vida (BAAD-HANSEN, 2008; PENNARROCHA *et al.*, 2012; PIGG *et al.*, 2013; SMITH *et al.*, 2013; FORSELL *et*

al., 2014).

Normalmente os casos são típicos de diversas consultas com inúmeros profissionais de várias especialidades sem um diagnóstico e tratamento comum, tendo, na maioria das vezes, tratamentos com objetivo de reduzir a dor, que incluem farmacoterapia, ajustes oclusais e cirurgia (BAAD-HANSEN *et al.*, 2008; PIGG *et al.*, 2013; FORSELL *et al.*, 2014; HAVIV *et al.*, 2014).

De acordo com Baad-Hansen (2008), mediante essas múltiplas condutas, por um tempo, vários pesquisadores acreditavam ser uma doença de origem psicogênica, todavia, essas hipóteses não foram aprovadas cientificamente.

O processo de lesão nervosa gera um processo inflamatório que induz à liberação de citocinas pró-inflamatórias, fatores de crescimento, enzimas hidrolíticas e óxido nítrico (NO), assim como redução do limiar de ativação dos nociceptores e incremento da excitabilidade da fibra nervosa (JULIUS; BASBAUM, 2001).

Outros mecanismos periféricos importantes no processo de lesão neuronal que vão adiante da inflamação e da liberação de mediadores inflamatórios são a liberação de neuropeptídeos e fatores neurotróficos, alterações degenerativas das fibras nervosas decorrentes do dano direto, como lesão axonal e desmienilização. Em lesões centrais e periféricas as citocinas fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucinas 1 beta (IL-1 β) e 6 (IL-6) estão presentes. O TNF- α é liberado em grande parte das células do sistema imunológico, assim como pelas células da glia, gerando alterações metabólicas e hemodinâmicas e ativando outras citocinas. Esta citocina proporciona a hiperexcitabilidade neuronal, incrementa a excitação e gera inflamação em diversos locais do sistema nervoso, sendo considerado um mediador expressivo da dor neuropática crônica, assim como um importante alvo terapêutico (AUSTIN; MOALEM-TAYLOR, 2010). A IL-1 β gera inflamação sistêmica, leva à produção de substância-P (SP) e NO, tendo importante função no desenvolvimento e na manutenção da dor. Já a IL-6 desenvolve maturação e ativação de neutrófilos, maturação de macrófagos e diferenciação de linfócitos-T citotóxicos. É principalmente pró-inflamatória na dor neuropática, levando a aumento da inflamação por meio da indução de células da glia no sistema nervoso central (AUSTIN; MOALEM-TAYLOR, 2010; DE OLIVEIRA *et al.*, 2011). Esta, pode vir a desencadear, no local da lesão, ação antinociceptiva e a regeneração do axônio periférico (SINGH; BEG; LOPEZ-OLIVO, 2010), sendo considerado um bom centro terapêutico para o tratamento da dor neuropática, quando comparado às outras citocinas (AUSTIN; MOALEM-TAYLOR, 2010).

De acordo com De Corato et al (2011) neuropeptídios também estão envolvidos na dor neuropática, visto que geram transformações na expressão destes, como SP, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), polipeptídeo vasoativo intestinal (VIP) e neuropeptídeo Y (NPY) no nervo trigêmeo e no gânglio trigeminal. Sugere-se, então, que a grande concentração de neuropeptídeos no local da lesão pode ter relação com a atividade neural ectópica e ao desenvolvimento e à modulação da dor neuropática.

Outro marcador que aparece em processos de neuronal é o Fator de Transcrição Ativador 3 (ATF-3). O ATF-3 é um pertencente da família de proteínas de ligação a elementos responsivos a ATF de fatores de transcrição básicos do tipo zíper de leucina e é induzido por diversas situações de estresse, incluindo lipopolissacarídeo (LPS) nas células endoteliais, células musculares lisas e macrófagos (HAI *et al.*, 1999; CAI *et al.*, 2000).

O ATF-3 surge em diversos sinais extracelulares, no entanto a maioria deles são caracterizados como sinais advindos do estresse, estando genes ligados a remodelação tecidual, reorganização citoesquelética, angiogênese, inflamação e reepitelização. O ATF3 é induzido durante as respostas celulares a muitos sinais de estresse e pode ser notificado como um gene induzível ao estresse (HAI *et al.*, 1999; KIM *et al.*, 2014; PEREIRA *et al.*, 2017).

O ATF-3 não é expressado de forma típica nos gânglios da raiz dorsal e medula espinhal, sendo somente induzido em neurônios submetidos a transsecção axonal. Esse marcador também é induzido em neurônios sensoriais e motores da medula espinhal após lesão do nervo, sendo, assim, considerado um marcador de injúria neuronal (TSUJINO *et al.*, 2000).

2 OPÇÕES DE TRATAMENTO PARA DOR OROFACIAL NEUROPÁTICA

Fármacos, como os analgésicos, antidepressivos e anticonvulsivantes são as principais escolhas para os tratamentos das dores neuropáticas, no entanto, possuem muitas contraindicações e muitos deles não são eficazes para algumas pessoas (RICHEIMER, 1997; FINNERUP *et al.*, 2001; BACKONJA, 2002; SCHESTATSKY *et al.*, 2008).

Dessa forma, considerando as inúmeras causas e a alta incidência da dor

orofacial na população e conseqüentemente os múltiplos tratamentos específicos e inespecíficos e a ausência de tratamento definitivo, são necessárias pesquisas para que se chegue a uma medida altamente eficaz para tratá-la. Devido seu caráter multifatorial, tratamentos conservadores e reversíveis veem sendo usados para amenizar o processo inflamatório (GONDIM, 2012; BALASUBRAMANIAM; KLASSER, 2014).

2.1 Tratamento medicamentoso

De acordo com Finnerup *et al.* (2001) o tratamento para dor neuropática é inespecífico, uma vez que grande parte dos pacientes fazem uso de drogas de eficácia não-demonstrada ou em subdoses da medicação apropriada. Esta, por sua vez, deve ser tratada com fármacos antidepressivos tricíclicos e anticonvulsivantes, já que a dor neuropática não possui boa resposta a analgésicos comuns.

2.1.1 Anticonvulsivantes e antidepressivos

A dor orofacial aguda pode, em geral, ser tratada com o arsenal terapêutico disponível, no entanto, a dor orofacial crônica (especialmente a de natureza neuropática), apresenta diagnóstico e tratamento difíceis. Um fator importante que influencia para o diagnóstico e tratamento da dor orofacial crônica é a incerteza da etiologia e patogênese (RICO *et al.*, 2016).

De acordo com Medawar; Matheus (2012) os antidepressivos tricíclicos (ADT's) e os gabapentióides são os fármacos de primeira escolha para o tratamento farmacológico da dor neuropática.

2.1.1.1 Amitriplina

A amitriplina é considerada o padrão-ouro dos analgésicos antidepressivos (MICÓ *et al.*, 2006). De acordo com Verdu *et al.* (2008) o mais importante mecanismo de ação é por meio do bloqueio da recaptção de serotonina e noradrenalina (monoaminas) na fenda sináptica. Estuda-se que esta age na dor neuropática através de seus efeitos sobre a serotonina e noradrenalina, promovendo a interação destas sobre os seus respectivos receptores localizados nos interneurônios inibitórios do corno dorsal da medula, aumentando a quantidade de sinapses,

gerando um incremento do limiar de ativação dos neurônios secundários da via nociceptiva. Dessa forma, a condução da dor ao talâmo fica prejudicada e a consequência é uma resposta inferior a esta condição. A amiptriplina também atua na inibição da recaptação de monoaminas, levando à resposta da dor, devido à ligação dos ADTs aos receptores opióides.

Sindrup et al (2005); Verdu et al (2008) complementam que o mecanismo de ação na dor neuropática pode estar ligada ao antagonismo de receptores N-metil-D-aspartato, canais de sódio e canais de cálcio voltagem- dependente, visto que a inibição destes canais é possível causar gerar uma queda nos impulsos nervosos, gerando hiperpolarização dos neurônios envolvidos na dor, inibir a exocitose de substâncias estimulatórias da resposta à dor (i.e. glutamato e substância P), assim como demais ações indiretas a este bloqueio.

No que diz respeito às condições clínicas para tratamento da dor neuropática mostrou-se que os ADT's possuem bons resultados, principalmente na dor neuropática periférica como polineuropatia diabética e não-diabética, neuralgia pós-herpética, síndrome dolorosa pós-mastectomia e em grupos de pacientes com diferentes condições de dor neuropática periférica (SINDRUP et al.,2005).

2.1.1.2 Gabapentinóides

Assim como os ADT's, os anticonvulsivantes, principalmente a gabapentina e pregabalina, são usados no tratamento da dor há bastante tempo, desde a década de 60, sendo considerados os mais importantes no tratamento da dor (PARK et al., 2010).

Santos et al (2011) afirmam que os anticonvulsivantes na dor neuropática atuam devido aos mecanismos fisiopatológicos parecidos com a epilepsia, em que ocorre uma hiperexcitabilidade neuronal presente em ambos casos. Sendo assim, os medicamentos são estabilizadores de membrana e agem por meio dos canais de sódio e cálcio voltagem-dependente, incrementando os efeitos inibitórios do ácido γ -aminobutírico (GABA) e reduzindo a transmissão excitatória do glutamato.

A gabapentina atua no alívio da dor, melhora do humor e distúrbios do sono em casos de dor neuropática mista, neuralgia pós-herpética, neuropatia diabética dolorosa, lesão na medula espinhal (FINNERUP et al., 2005) e dor por membro fantasma (JENSEN et al., 2009). Atua como neuromodulador através da ligação seletiva à subunidade protéica $\alpha 2\delta$ dos canais

de cálcio voltagem- dependente em várias áreas do cérebro e no corno dorsal da medula espinhal (HOWARD et al. 2011).

A pregabalina, por sua vez, possui efeitos parecidos com a gabapentina e atua gerando uma redução do influxo de cálcio nos neurônios, seguido da inibição da liberação de neurotransmissores excitatórios relevantes na produção da dor. Possui ainda início de ação mais rápido e efeito ansiolítico (SANTOS et al., 2011), porém com custo mais elevado quando comparado a gabapentina.

2.1.2 Metformina

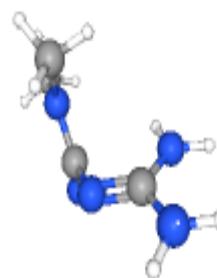
A metformina (MET) é um composto derivado da espécie *Galega officinalis* (Figura 2) que era usada em algumas regiões da Europa no período da Idade Média para o tratamento de pacientes com poliúria, e posteriormente, no Diabetes Mellitus (WITTERS, 2001; BAILEY; DAY, 2004).

Figura 2. Espécie vegetal *Galega officinalis*.



Fonte: Bailey e Day (2004).

Figura 3. Estrutura química da metformina.



Fonte: Pubchem (2019).

A metformina é classificada como uma biguanida e é usada no tratamento da diabetes tipo 2. No entanto, seu mecanismo de ação ainda não está completamente elucidado. Ela facilita a captação muscular de glicose desencadeada pela insulina, assim como em outros tecidos periféricos, podendo também diminuir o apetite, e levar

a perda de peso. Atua no hepatócito, levando a um processo de inibição da gliconeogênese e da glicogenólise, e estimulação da glicogênese. Em contrapartida, nos tecidos periféricos insulino-dependentes, especialmente na musculatura esquelética, desencadeia acréscimo da captação de glicose levando a uma diminuição acelerada da glicemia plasmática. Somado a ação do metabolismo glicídico, ainda atua no metabolismo lipídico, reduzindo os triglicérides plasmáticos e os ácidos graxos livres em decorrência de inibição da lipólise. Possui ainda efeito relaxante no endotélio diminuindo levemente a pressão arterial (CUSI; DEFRONZO, 1998; DeFRONZO, 1999; ZHOU *et al.*, 2001).

A nível molecular, os principais efeitos gerados pela MET são em consequência da ativação (exceto no hipotálamo) da proteína quinase ativada pela adenosina monofosfato (AMPK) (ZANG *et al.*, 2004; DZAMKO *et al.*, 2009; LIM; KOLA, Blrtins; KORBONITS, 2010).

A AMPK em estado de ativação, é responsável pelo metabolismo da glicose e dos lipídios, expressão gênica e síntese protéica. A AMPK atua no fígado, músculo esquelético, coração, tecido adiposo e pâncreas. Esta sofre ativação quando há redução do conteúdo celular e sua maior ação é desativar as vias consumidoras de ATP e estimular as vias metabólicas produtoras de ATP (ZHOU *et al.*, 2001; HARDIE, 2003).

Hardie (2003) complementa que a AMPK é responsável pelo equilíbrio energético celular e é ativada pelo aumento da razão AMP/ATP. A AMPK, por sua vez, é um inibidor do alvo da rapamicina (mTOR) de mamíferos e da sinalização da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK).

A ativação da AMPK reduz a excitabilidade dos neurônios do gânglio da raiz dorsal e os ativadores da AMPK são eficazes na redução da dor crônica em modelos inflamatórios, pós-cirúrgicos e neuropáticos de roedores (PRICE; DAS; DUSSOR, 2016; TERENCEIO *et al.*, 2018).

Quando ocorre a lesão do nervo periférico há aumento da sinalização de mTOR e MAPK, notificando que a ativação dessas vias de sinalização tem sido associada ao aumento da excitabilidade do nociceptor. A metformina, por sua vez, diminui a excitação mecânica e a excitabilidade do nociceptor (MELEMEDJIAN *et al.*, 2010; MELEMEDJIAN *et al.*, 2011; TILLU *et al.*, 2012; MELEMEDJIAN *et al.*, 2013; MOY *et al.*, 2017; TERENCEIO *et al.*, 2018;).

Das *et al.* (2019a) afirmam que realização de um tratamento precoce com metformina pós-trauma é capaz de reprimir a alodinia mecânica em um modelo complexo de síndrome de dor regional em camundongos. Sugere-se ainda, que os ativadores da proteína quinase ativada por AMP podem ser um alvo terapêutico viável para o tratamento da dor associada à síndrome dolorosa regional complexa. A ativação de vias opioidérgicas medeia parcialmente a atividade antinociceptiva da metformina. Em conjunto, os resultados indicam que a metformina deve ser mais investigada visando seu reposicionamento no tratamento de pacientes com diferentes condições dolorosas.

3 FOTOBIMODULAÇÃO

3.1 Características do laser de baixa potência

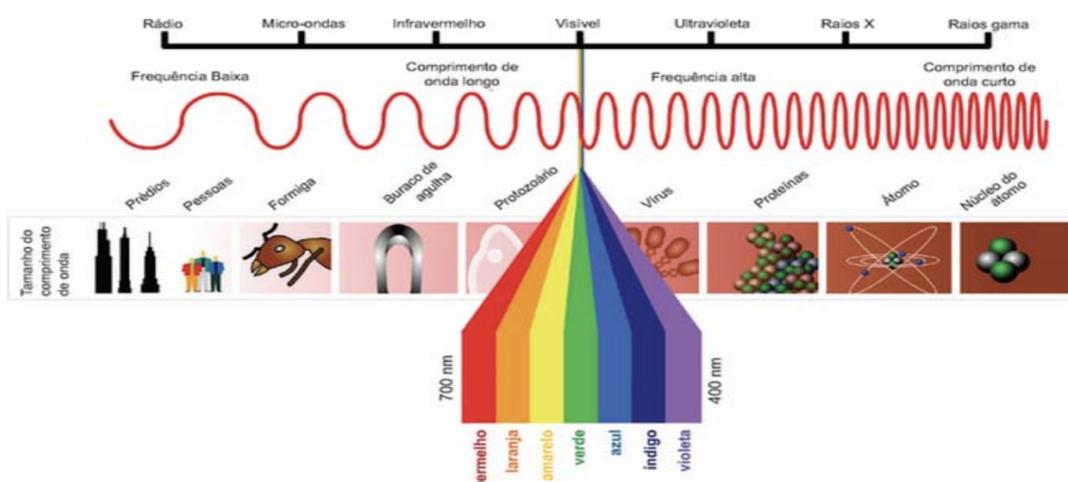
A palavra “*laser*” é um acrônimo em língua inglesa de “*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*”, ou seja, amplificação de luz por emissão estimulada de radiação. A radiação emitida pelo *laser* é de origem eletromagnética não ionizante, podendo vir a ser visível ou invisível (AGNE, 2017).

O primeiro *laser* foi construído em 1960 por Theodore Mainan, com cristal de rubi. Já em 1962, Leon Goldman usou o primeiro *laser* de alta potência ou *laser* cirúrgico, visto que possuía potência acima de 1 W e características ablativas. O *laser* de baixa potência, por sua vez, só surgiu na década de 1970, com o médico e professor húngaro Endre Mester, com objetivo de estímulo de cicatrização tecidual, sendo usado na cicatrização de feridas e úlceras abertas inicialmente (OLIVEIRA *et al.*, 2014).

O *laser* atua através de propriedades com uma radiação de alta energia, sendo empregado um comprimento de onda específico de acordo com o objetivo terapêutico (Figura 4). O comprimento de onda atua por meio de células alvos, conhecidas como cromóforos, que são capazes de absorver aquela luz e atuar de maneira específica para cada tipo de terapêutica. Os efeitos biológicos da terapia de *laser* de baixa potência baseiam-se em que um ou mais cromóforos absorvem a luz e provocam efeitos fisiológicos e modulação bioenergética. A depender do cromóforo alvo é desencadeado um tipo de reação específica (SUTHERLAND, 2002; BORGES; SCORZA, 2016; MARTINS, 2017).

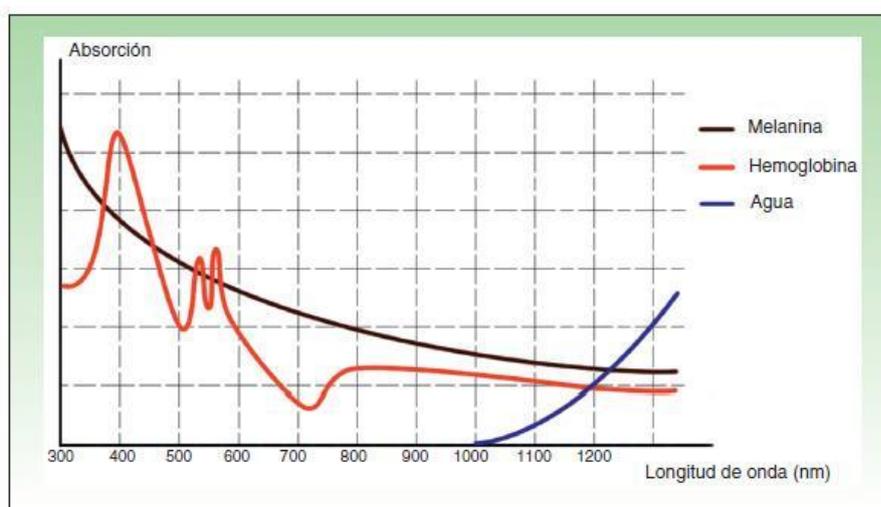
De acordo com Huang *et al.* (2009) os principais cromóforos absorvidos pelos tecidos humanos são: ácido nucléico, proteína, hemoglobina, melanina, água, lipídios, flavinas, porfirinas, citocromo C oxidase. O comprimento de onda, por sua vez, é determinado de acordo com a localização da cavidade óptica que se encontra à volta do meio, que irá produzir o feixe de luz (Figura 5).

Figura 4. Representação do espectro eletromagnético e os seus diferentes comprimentos de onda.



Fonte: Adaptado de Garcez, Ribeiro e Núñez (2012).

Figura 5. Representação da curva de absorção dos principais cromóforos absorvidos pelo laser



Fonte: Adaptado de González-Rodríguez e Lorente-Gual (2015).

As características distintas entre os diversos tipos de *lasers* são vistas pelas variações nos comprimentos de onda, assim como os efeitos biológicos intimamente

relacionados com a dose. Podem ser caracterizados como *lasers* contínuos e pulsados (ZECCHA *et al.*, 2016).

3.2 Interação da luz com os tecidos biológicos

Em meados dos anos 60 e 70 o pesquisador Endre Mestre se dedicou a descobrir como os *lasers* de baixa potência, responsáveis pelos efeitos atérmicos, atuavam nos tecidos biológicos. Observaram que a luz interage com os tecidos biológicos por meio de dois mecanismos: absorção e dispersão. Absorção é a capacidade de os tecidos biológicos absorverem um fóton em sua totalidade. Já a dispersão caracteriza-se pela passagem dos fótons caminharem em direção ao nível de energia, a medida que passam por diferentes tecidos (SOUSA *et al.*, 2012).

O mecanismo biológico particularmente envolvido com os efeitos do *laser* é apontado pela absorção da luz vermelha e infravermelha por cromóforos, em especial, o Citocromo C Oxidase (CCO), sendo uma unidade da cadeia respiratória localizado no interior das mitocôndrias. Possui como hipótese que a absorção dessa energia luminosa desencadei uma fotodissociação do óxido nítrico inibitório de CCO, provocando um incremento na atividade enzimática, deslocamento de elétrons, promovendo a respiração mitocondrial e geração de trifosfato de adenosina (ATP) (KARU; KOLYAKOV, 2005).

Sendo assim, o tratamento com *laser* de baixa potência é capaz de modificar o estado redox da célula, levando a um processo de estímulo de diversas vias de sinalização intracelular, modificando a interação dos fatores de transcrição ligados à proliferação celular, à sobrevivência, ao reparo tecidual e à regeneração (CHUNG *et al.*, 2012; AVCI, 2013).

As luzes vermelhas e infravermelhas são absorvidas por cromóforos específicos localizados na mitocôndria. É desencadeada na cadeia respiratória, produção de ATP em maior quantidade, geração de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e liberação ou geração de Óxido Nítrico (NO). Estas respostas, por sua vez, podem modificar a transcrição através da ativação dos fatores de transcrição (COSTA, 2015).

EROs vem sendo estudados na laserterapia devido haver um incremento de sua concentração em consequência da laserterapia, de modo que a síntese de ATP aparenta

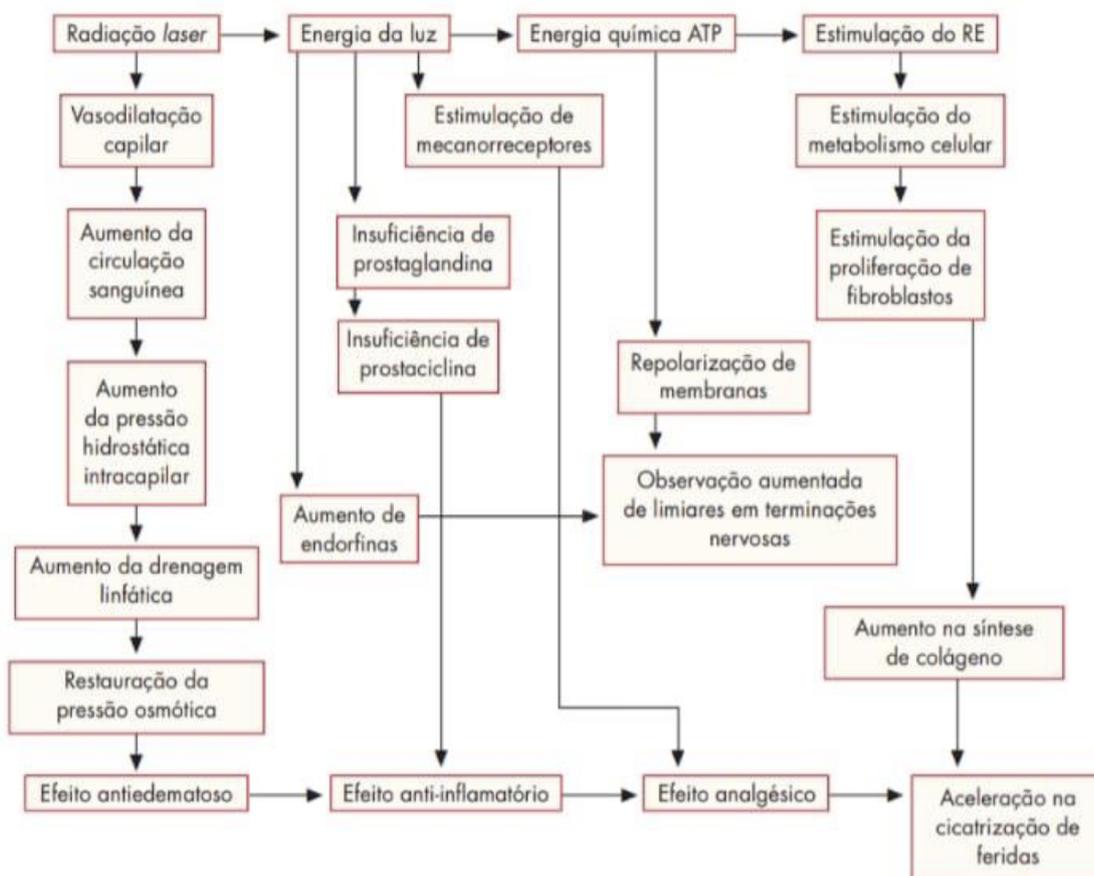
possuir a mesma correlação (LUBART *et al.*, 2005; WONG-RILEY *et al.*, 2005; HU *et al.*, 2007; LAPCHAK; DE TABOADA, 2010; CHEN *et al.*, 2011).

Outro estudo evidenciou que o pico de incremento da síntese de ATP é alcançado 5 min após a irradiação e diminui até os níveis basais em 6 horas (CHEN *et al.*, 2011).

3.3 Efeitos terapêuticos do *laser* de baixa potência

Laser de baixa potência é atérmico e quando ocorre aumento da temperatura local é em consequência do aumento do metabolismo celular e da vasodilatação provocada na região. Os principais efeitos casuados são efeitos não térmicos, como efeitos fotoquímicos, fotofísicos e fotobiológicos (RIBEIRO; ZEDEL, 2004), exercendo efeito terapêutico a atermia, fotobiomodulação e interação celular (FORTUNY; GALLARDO; LIBANEO, 2018) (Figura 6).

Figura 6: Efeitos atribuídos à fototerapia com *lasers* em baixa intensidade.



Fonte: Ribeiro e Zezell (2004).

Legenda:

ATP = trifosfato de adenosina;

RE = retículo endoplasmático.

O laser de baixa potência atua principalmente em células debilitadas, ou seja, sobre órgãos e tecidos enfraquecidos, como alguma desordem funcional (RIBEIRO; ZECELL, 2004).

3.3.1 Processo de reparo

O processo de reparo é constituído por diferentes episódios, como a inflamação, a proliferação celular e a síntese de elementos constituintes da matriz extracelular, incluindo as fibras colágenas, elásticas e reticulares (PUGLIESE *et al.*, 2003).

Sendo assim, a inflamação é tida como uma reação tecidual após ter sofrido uma agressão local. Ocorre nas primeiras horas após a lesão e desencadeia diversos processos biológicos que servirão para reconstruir o tecido lesado (COLLINS, 2000).

Em consequência a fase inflamatória ocorre um processo de remoção do exsudato e das células mortas, em que irá substituir o tecido lesado por células do tecido conjuntivo, havendo assim, a reposição por um tecido igual ao original, iniciando o processo de cicatrização. Essa é a fase proliferativa (CÂMARA; CARVALHO, 1997).

3.3.2 Mecanismos anti-inflamatórios e analgésicos do laser terapêutico

Em processo de lesão tecidual ocorre uma série de fatores que levam ao desencadeamento de um ambiente com alterações a nível tecidual, como a redução do pH e da concentração de oxigênio, aumento dos níveis de ATP circulante e liberação de mediadores químicos (HOUCK *et al.*, 2011).

Diante desse ambiente alterado, Taylor e Moncada (2010) complementam que as células íntegras se adaptam, de modo que na presença de baixas concentrações de oxigênio na mitocôndria ocorre a liberação de Fator Induzido por Hipóxia-1 (HIF1) que promove ligações irreversíveis com subunidades no Citocromo C-Oxidase (Cco).

O laser de baixa potência atuará quebrando essas ligações e ajuda no processo

de respiração mitocondrial, leva a reestruturação de vários processos metabólicos e consequentemente, melhorando o quadro inflamatório (BARATTO *et al.*, 2011).

O laser possui como mecanismo de ação principal a fotobiomodulação que ocorre por meio do estímulo dos itens da cadeia respiratória mitocondrial. Dessa forma irá desencadear uma cascata de sinalização gerando a proliferação celular e a citoproteção. Uma grande parte das evidências relacionam que o citocromo c-oxidase (complexo 4) é o fotorreceptor de luz vital (EELLS *et al.*, 2004). (Figura 8)

Em estudo realizado por Silveira, Streck e Pinho (2007) verificaram que o succinato desidrogenase (complexo II) também é ativado por esta irradiação. A mitocôndria possui boa capacidade de receber a luz monocromática do *laser*, incrementando, assim, o metabolismo respiratório de algumas células, promovendo efeitos biomodulatórios.

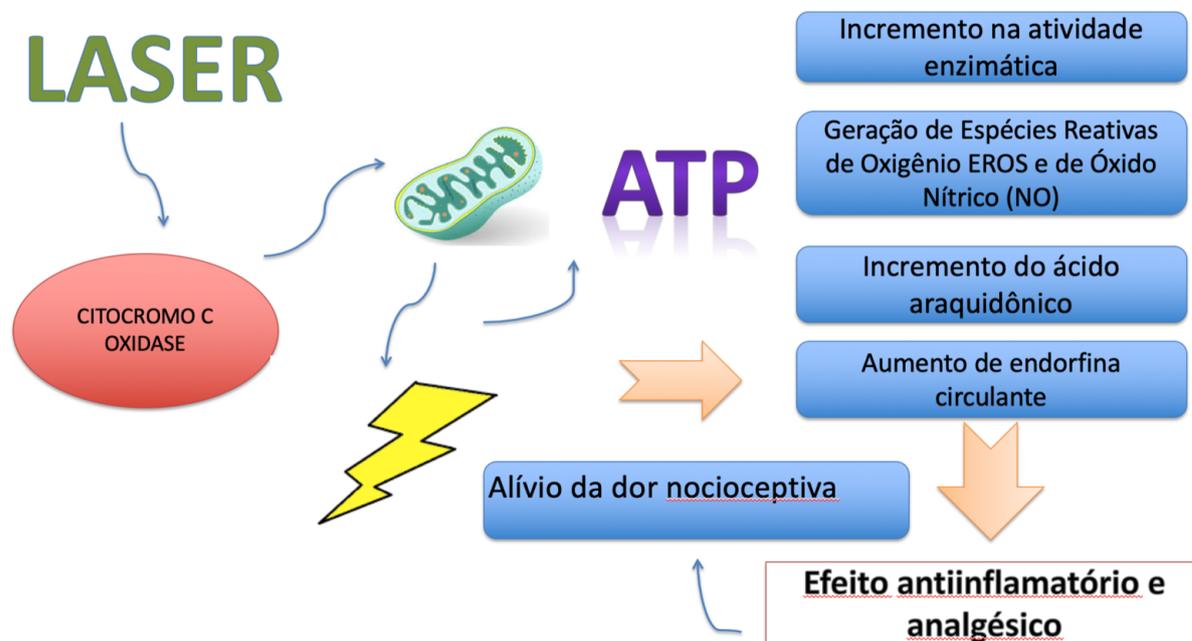
O *laser* de baixa potência possui uma das suas principais funções, a redução da inflamação, em decorrência da diminuição dos mediadores químicos inflamatórios (prostaglandinas, leucócitos e fator de necrose tumoral), leva também ao incremento da concentração de proteínas dos mediadores químicos, como a interleucina 10 (IL10) e da proteína do choque térmico (HSP) (BJORDAL; LOPES-MARTISN; IVERSEN, 2006).

Outros estudos mostraram que o *laser* de baixa potência modula e acelera a cicatrização tecidual por atuar no aumento da atividade mitótica, fibroblastos, síntese de colágeno, neovascularização e reduz inflamação e estresse oxidativo (CARVALHO *et al.*, 2006; FATHABADIE *et al.*, 2013; GONÇALVES *et al.*, 2013).

A ação benéfica da irradiação *laser* induz a ativação de células (leucócitos, fibroblastos, queratinócitos etc.) expressas em aumento da atividade bactericida, proliferação celular e produção de proteínas e citocinas. Esses eventos produzirão efeitos clínicos como cicatrização de feridas, incremento na microvascularização, regeneração e imunomodulação (VLADIMIROV; OSIPOV; KLEBANOV, 2004). (Figura 7).

Diversos estudos também vêm sendo desenvolvidos para mostrar o alívio da dor nociceptiva e neuropática por conseguir inibir parcialmente a condução nervosa e redução da estimulação aferente (HAMBLIN *et al.*, 2017). (Figura 7).

Figura 7. Esquema representativo da atuação do Laser de baixa potência nos sistemas biológicos para alívio da dor nociceptiva.



Fonte: Elaborada pela pesquisadora (2019).

Existem alguns mecanismos de ação responsáveis pela diminuição da dor, que seria por meio da redução do estresse oxidativo e fadiga dos músculos esqueléticos, inibição da transmissão na junção-neuromuscular, diminuindo a sensibilidade no pontos dolorosos e efeitos anti-inflamatórios (LOPES-MARTINS *et al.*, 2006).

A aplicação do *laser* atua bloqueando parcialmente a condução nervosa, principalmente as fibras Ad e C, que transmitem os estímulos nociceptivos, assim como a liberação de serotonina no SNC como um mecanismo de redução da dor nos nervos periféricos (CHOW *et al.*, 2009).

Zeng (2018) acrescentou que emissões de comprimento de onda de 650 a 830nm com o *laser* de baixa potência é capaz de reduzir a dor pós-operatória.

3.4 Tipos de lasers

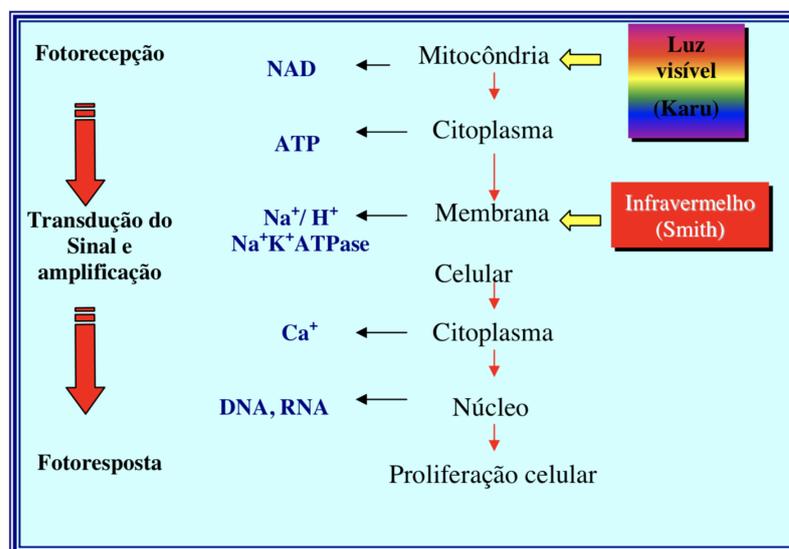
3.4.1 Laser vermelho X Laser infravermelho

As irradiações vermelha e infravermelha são responsáveis por gerar uma reorganização a nível do metabolismo celular, induzindo, assim, a processos de ativação metabólica e ativação celular. A luz torna-se o ponto gatilho para indução desses processos. Dessa forma, as doses usadas para desencadear bioestimulação são baixas (0,1 a 10J/cm²), com tempo de irradiação curto (10 a 100s) (KARU, 1989).

A luz visível vermelha é capaz de gerar estímulo aos sistemas biológicos, em que ocorre alterações fotoquímicas nos receptores mitocondriais e conseqüentemente, altera o metabolismo celular (Figura 8) (KARU, 1989).

A radiação infravermelha, por sua vez, desencadeia rotações e vibrações moleculares, propriedades diferentes da radiação visível. Sendo assim, sugere-se que luz infravermelha, em decorrência das suas propriedades fotofísicas e fotoquímicas, seja capaz de gerar a cascata de eventos metabólicos por meio de efeitos fotofísicos nas membranas, atuando nos canais de cálcio. Mesmo possuindo efeitos diferentes, o *laser* vermelho e infravermelho possuem respostas iguais (Figura 8) (RIBEIRO; ZECELL, 2004).

Figura 8. Modelos para estimulação dos sistemas biológicos pelo laser em baixa potência.



Fonte: Adaptado de Smith (1991).

O *laser* infravermelho possui melhor efeito na redução da dor, devido possuir um comprimento de onda maior e permitir atingir maiores profundidades de tecido (ÖZDEMIR; BIRTANE; KOKINO, 2001; HAKGUDER *et al.*, 2003; KREISLER *et al.*, 2003; MATERA; TATARUNAS; OLIVEIRA, 2003; CHOW *et al.*, 2004; GUR *et al.*, 2004; NES; POSSO, 2005).

4 JUSTIFICATIVA

A dor orofacial atinge cerca de 30 a 40% da população brasileira, sendo motivo preponderante de absenteísmo, licenças médicas, aposentadoria precoce, indenizações trabalhistas e baixa produtividade (RUVIARO; FILIPPIN, 2012).

Os medicamentos antidepressivos e anticonvulsivantes são grandes aliados ao combate da dor neuropática, porém devido as suas contraindicações, alta capacidade de dependência física e efeitos colaterais, outros medicamentos, possibilidades terapêuticas e associações de tratamentos vêm sendo propostas. A metformina, por sua vez é um medicamento de baixo custo, já conhecido há muito tempo na Medicina com uma boa opção terapêutica nas desordens ligadas a diabetes, e em pesquisas mais recentes o seu efeito positivo já foi observado quando se trata de efeito nociceptivo em dor de caráter neuropático.

O *laser* é um recurso muito usado em processos inflamatórios e dolorosos, já sendo respaldado em diversos estudos por seus mecanismos bioestimuladores. Excita as mitocôndrias celulares, desencadeando um incremento na produção de ATP intracelular, fundamentando seu efeito antiedematoso e antiinflamatório, levando, assim a aumento da endorfina circulante favorecendo a ação analgésica na dor inflamatória. Dessa forma, o uso do laser terapêutico é uma ótima opção, de fácil acesso, baixo custo e com boa resposta no manejo da dor, em especial, a de caráter neuropático.

Sendo assim, propomos esta pesquisa, que se torna inédita, ao usar a metformina e a fotobiomodulação, associadas ou não, no controle da dor orofacial neuropática.

5 OBJETIVOS

5.1 Geral

Analisar o efeito da fotobiomodulação e da metformina na neuralgia trigeminal experimental e a influência do hipoestrogenismo.

5.2 Específicos

- Avaliar o comportamento nociceptivo orofacial em ratas ovariectomizadas na neuralgia trigeminal.
- Apreciar o possível efeito antinociceptivo da metformina em ratas normais e ratas ovariectomizadas na neuralgia trigeminal.
- Verificar o possível efeito antinociceptivo da fotobiomodulação em ratas normais e ratas ovariectomizadas na neuralgia trigeminal.;
- Avaliar o efeito antinociceptivo da associação entre metformina e fotobiomodulação em ratas normais e ratas ovariectomizadas na neuralgia trigeminal;
- Investigar o efeito neuroprotetor da metformina no gânglio trigeminal;
- Investigar a participação do m-TOR e ATF-3 no efeito neuroprotetor da metformina no gânglio trigeminal.

6 MÉTODOS

6.1 Animais

Os experimentos foram realizados em ratas (*Rattus norvergicus*, variedade albina) Wistar, fêmeas maduras, com peso entre 150 a 250 g, provenientes do Núcleo de Biologia Experimental (NUBEX), da Universidade de Fortaleza (UNIFOR), mantidas em gaiolas depolissulfona e policarbonato, em condições controladas de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e luminosidade (ciclos claro/escuro de 12 horas), em instalação específica de patógenos livres (SPF) em Gaiolas *Techniplast* de VCI (5 animais / cada) com livre acesso a água autoclavada e dieta com ração extruzada (Purina, São Paulo, Brasil).

Os experimentos foram desenvolvidos em sala silenciosa, com exaustão de gases, mantendo-se o controle da temperatura e sempre durante a fase clara do ciclo. Os protocolos experimentais seguiram as diretrizes éticas do Conselho Nacional para o Controle da Experimentação Animal (CONCEA) e foram aprovados pelo Comitê de Ética em para uso de animais da UNIFOR (CEUA) sob os números 8811280818 e 9601181117.

6.2 Grupos experimentais

As ratas foram distribuídas em 14 grupos de seis animais cada, conforme o Quadro I:

Quadro 1 - Grupos experimentais e respectivos tratamentos.

Grupo (n = 6/cada)	Tratamento
Grupo 1- CT1 (Controle)	Ratas normais + IONX
Grupo 2- CT2 (Controle)	Ratas OVX + IONX
Grupo 3 – MET1(250mg/kg)	Ratas normais + IONX + MET
Grupo 4 – MET2 (250mg/kg)	Ratas OVX + IONX + MET (250mg/kg)
Grupo 5 – LASER1	Ratas normais + IONX + LASER
Grupo 6 – LASER2	Ratas OVX + IONX + LASER
Grupo 7 – INFRALASER1	Ratas normais + IONX + INFRA
Grupo 8 – INFRALASER2	Ratas OVX + IONX + INFRA
Grupo 9 – METLASER1	Ratas normais + IONX + MET(250mg/kg) + LASER
Grupo 10 – METLASER2	Ratas OVX + IONX + MET(250mg/kg) + LASER
Grupo 11 – METINFRA1	Ratas normais + IONX + MET(250mg/kg) + INFRA
Grupo 12– METINFRA2	Ratas OVX + IONX + MET(250mg/kg) + INFRA
Grupo 13– SHAM	Sham: animais fêmeas OVX + falso IONX
Grupo 14– NAIVE	Naive: animais fêmeas normais

Fonte: Elaborado pela pesquisadora.

Legenda:

CT – Controle

OVX - Ovariectomizada;

IONX – cirurgia do nervo infraorbital;

MET - metformina; *LASER* – *laser* vermelho; INFRA – *laser* infravermelho.**6.3 Indução do hipoestrogenismo**

O hipoestrogenismo foi induzido por ovariectomia bilateral (OVX), cirurgia para retirada dos ovários, provocando assim uma queda nos níveis de estrógeno, simulando uma menopausa. Os animais foram submetidos à anestesia geral, com a mistura cloridrato de cetamina (100 mg/kg) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg) por via intraperitoneal. Após o estabelecimento do plano anestésico, verificado pela ausência de reflexos motores e protetores, os animais foram submetidos à ovariectomia bilateral.

As ratas anestesiadas foram posicionadas em decúbito dorsal em uma tábua confeccionada com madeira e coberta com EVA, e suas patas foram presas com fita adesiva. A superfície abdominal foi submetida a assepsia com iodopovidine e com iodo ativo a 3%. A laparotomia foi realizada em condições semi-assépticas através de incisão cirúrgica com lâmina de bisturi na região abdominal. Todo o material utilizado na cirurgia foi previamente esterilizado em autoclave de bancada por 60 min. O trato reprodutor foi examinado para confirmação da normalidade

Os planos foram divididos, os ovários foram visualizados e então foi feita a excisão destes órgãos. A hemostasia foi realizada com fio cirúrgico de nylon da marca Procure 4.0. Em seguida, as ratas foram colocadas em gaiolas separadas e observadas até o retorno as condições normais. Nos dias seguintes, as ratas foram acompanhadas a fim de notificar a boa evolução cirúrgica, por meio da cicatrização tecidual, boa movimentação e alimentação adequada do animal (Figura 9).

Figura 9: Etapas da cirurgia de ovariectomia bilateral (OVX). O círculo azul indica o ovário da rata.



Fonte: Acervo da pesquisadora (2019).

Para o grupo sham, procedimentos gerais semelhantes ao descrito anteriormente foram realizados, exceto que durante o ato cirúrgico, em que os ovários foram exteriorizados, porém não foram removidos. Um grupo de fêmeas que não sofreu procedimento cirúrgico foi utilizado para controle (Naive). Três dias após o procedimento cirúrgico, os animais dos grupos OVX, sham e naive tiveram suas citologias hormonais vaginais avaliadas diariamente durante quinze dias. O peso corporal de cada animal foi registrado durante todo o experimento.

6.4 Avaliação do ciclo estral

O ciclo estral de todos animais foi acompanhado por citologia vaginal durante uma semana antes da cirurgia, e os animais que não ciclaram regularmente foram retirados do experimento. Após 20 dias de repouso das ratas, as mesmas foram

acompanhadas por citologia vaginal a fim de verificar a fase do ciclo estral a qual se encontravam.

Dessa forma, a secreção vaginal das ratas foi coletada e o lavado vaginal não corado foi observado a fresco, em microscópio ótico (LONG; EVANS, 1922; HOAR; HICKMAN, 1975).

Devido a ação dos hormônios sexuais (estrogênios e progesterona) sobre o epitélio vaginal podemos avaliar a fase do ciclo estral. Os estrogênios causam proliferação e queratinização, já a progesterona promove mucificação. O uso das objetivas de aumento de 10 vezes facilitou a análise da proporção entre os três tipos celulares presentes no material. O uso das objetivas de aumento de 40 vezes permitiu o reconhecimento de cada um dos tipos celulares (VILELA; SANTOS JÚNIOR; SILVA, 2007).

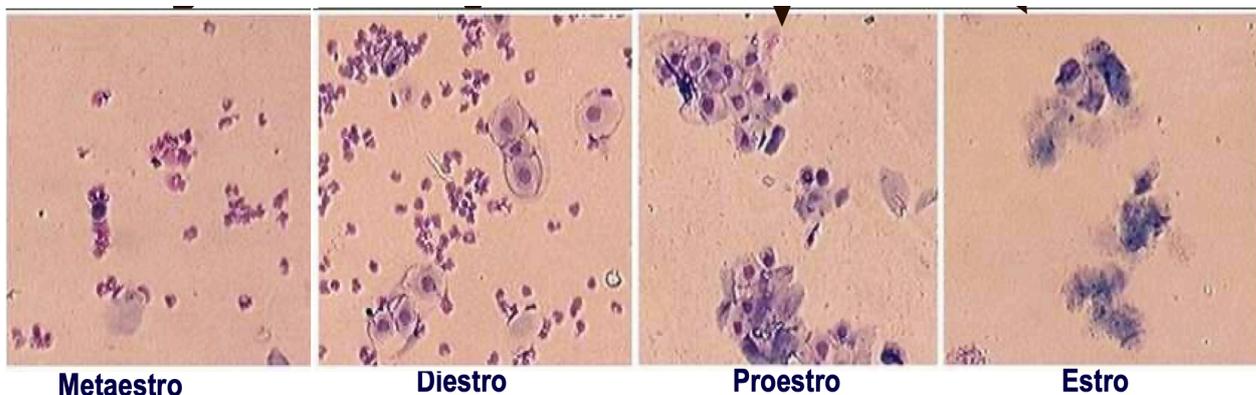
Para a coleta do lavado vaginal, as ratas foram contidas e colocou-se uma pipeta de plástico preenchida com volume de 10 μ L de solução salina (NaCl a 0,9 %) inserindo a ponta na vagina do rato, mas não profundamente, e coletou-se material suficiente para observação da citologia vaginal. O fluido vaginal foi colocado em lâminas de vidro e uma lâmina de vidro diferente foi usada para cada animal. Uma gota foi coletada com uma ponta limpa de cada rata.

Os tipos celulares do esfregaço vaginal de ratas e a característica celular define a fase do ciclo estral da rata podem ser verificados na Figura 11. A rata é um animal do tipo poliestro, em que apresenta ciclos estrais curtos e sucessivos. A maioria das ratas, cerca de 60 a 70% possuem um ciclo estral de 4 - 5 dias. Porém algumas ratas desenvolvem ciclos mais regulares e outros irregulares. As irregularidades são definidas no momento em que a rata permanece numa mesma fase, durante 4 - 5 dias, ou ciclos, em que a oscilação entre as fases não segue a ordem de proestro, estro, metaestro e diestro. O proestro habitualmente possui uma durabilidade de 15 horas, o estro 12 horas, o metaestro de 12 horas e o diestro de 48 - 62 horas (VILELA; SANTOS JÚNIOR; SILVA, 2007).

O esfregaço de um metaestro possui células epiteliais acidófilas anucleadas e nucleadas, células cianófilas e leucócitos em mesma proporção (Figura 10). O esfregaço de diestro há predominância de leucócitos (Figura 11), já o do proestro possui predominância de células epiteliais acidófilas e eosinófilas nucleadas (Figura

12), e por fim, o estro tem grande quantidade de células cornificadas anucleadas (Figura 13) (VILELA; SANTOS JÚNIOR; SILVA, 2007).

Figura 10. Metaestro Figura 11. Diestro. Figura 12. Proestro Figura 13. Proestro

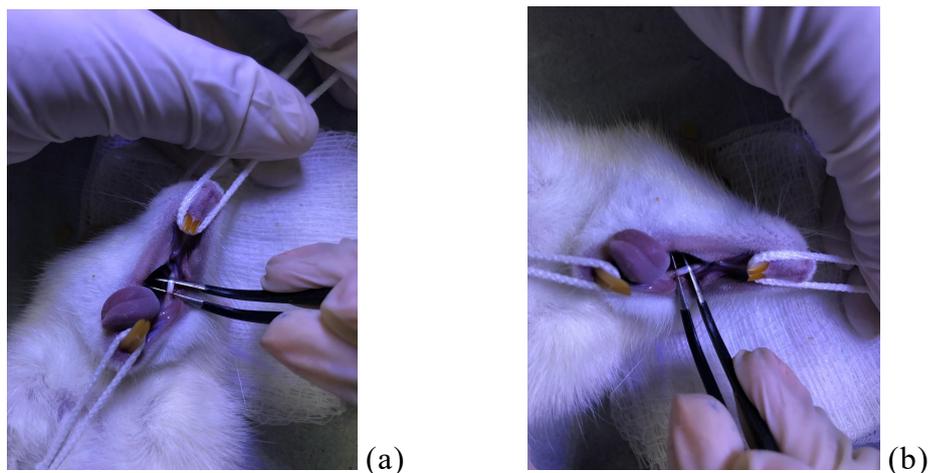


Fonte: Marcondes, Bianchi e Tanno (2002).

6.5 Neuragia trigeminal experimental por transecção do nervo infraorbital (IONX)

Após o período de acompanhamento (20 dias), as fêmeas dos grupos OVX foram submetidas à cirurgia de transecção do nervo infraorbital (IONX). Os animais operados foram previamente anestesiados com uma mistura de cloridrato de cetamina e cloridrato de xilazina (ver 8.2). O nervo infraorbital foi dissecado dos tecidos adjacentes, através de uma incisão de 2 mm (Figura 14 a, b). O grupo sham foi submetido ao mesmo procedimento cirúrgico, porém não houve a transecção do feixe nervoso. Já o grupo naive não passou por nenhum procedimento. As ratas foram devolvidas as suas gaiolas e alimentados com purê de comida triturada e monitoradas diariamente durante o pós-operatório (IMAMURA; KAWAMOTO; NAKANISHI, 1997).

Figura 14. Cirurgia do nervo infraorbital (IONX) (a; b).

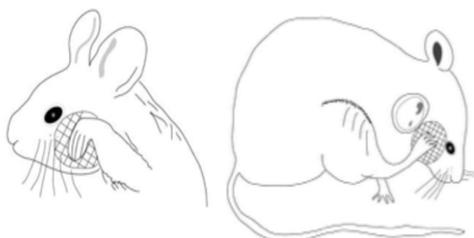


Fonte: Acervo da pesquisadora (2019)

6.6 Avaliação da hipersensibilidade ao frio

No dia anterior à cirurgia (IONX) os animais receberam 50 μ L de acetona na vibrissa ipsilateral e avaliou-se a quantidade de vezes em que a rata friccionou (*rubbing*; Figura 15) a área afetada por 1 minuto (área ipsilateral e contralateral). Esse protocolo foi repetido nos dias 1, 3, 5, 7, 10 e 14 pós-cirúrgico. Os animais dos grupos controle e sham receberam tratamento com veículo (salina; via oral - v.o), e os grupos teste receberam metformina na dose de 250 mg/kg (v.o), laser vermelho 2J ou infravermelho 2J. Outros grupos receberam a combinação dos recursos.

Figura 15. Representação esquemática do comportamento de *rubbing* facial com as patas dianteiras e traseiras em roedor.



Fonte: Romero-Reyes *et al.* (2013)

O teste da acetona é caracterizado por uma medida da alodinia a frio e mensura os comportamentos aversivos provocados pelo resfriamento evaporativo. A acetona pode ser esfregada ou pulverizada na superfície plantar da pata traseira ou na região periorbital. A acetona é decorrente de um resfriamento da pele às temperaturas de 15

– 21°C, podendo variar de acordo com a temperatura da sala, temperatura da pele e da quantidade de acetona aplicada (CARLTON *et al.*, 1994; CHOI *et al.*, 1994; VISSERS; MEERT, 2005).

Um aplicador foi treinado para a realização da aplicação da acetona na região das vibrissas, assim como para a contagem do número de coçadas na região. O aplicador não possuía conhecimento do tipo de tratamento que os animais receberam.

6.7 Aplicação do *laser* terapêutico

Foi utilizado o equipamento de Laser AsGa de baixa intensidade (*Gallium Arsenium*, KLD Biosistemas Equipamentos Eletrônicos Ltda., Brasil; Modelo LLT1307), operando com dois comprimentos de onda: 660 nm para o *laser* vermelho e 904 nm para o *laser* infravermelho durante todo o experimento para irradiação na região do nervo infraorbital animais, de acordo com o grupo selecionado.

Tanto para o *laser* vermelho, quanto para o infravermelho, em caráter analgésico utiliza-se uma fluência de 1 a 3J/cm². Para fins terapêuticos e de padronização, utilizamos 2J/cm² (MARTINS, 2017).

Os parâmetros dos *lasers* foram os seguintes:

a) *Laser* Vermelho (aplicador APLC 660): Frequência: 80 Hz; Modo: contínuo; Potência 100 mW; Comprimento de onda 660 nm; Largura de pulso: 100 ns; Área de abrangência: 0,035 cm²; Energia usada: 2 J; Tempo de aplicação: 20 s (Quadro 2) (KLD, s.a).

b) *Laser* Infravermelho (aplicador APLP 904): Frequência: 80 Hz; Modo: contínuo; Potência 70 mW; Comprimento de onda 904 nm; Largura de pulso: 100 ns; Área de abrangência: 0,010 cm²; Energia usada: 2 J; Tempo de aplicação: 30 s (Quadro 2) (KLD, s.a).

O programa de utilização do *laser* terapêutico constou da aplicação durante 14 dias ininterruptos de *laser* vermelho e infravermelho, sendo 1 vez ao dia (Figuras 16 e 17). Vale ressaltar que o tempo de aplicação do laser vermelho foi menor, por possuir uma potência maior.

Figura 16: Aplicação laser vermelho (660nm).



Figura 17: Aplicação laser infravermelho (904nm).



Fonte: Acervo da pesquisadora (2019).

Fonte: Acervo da pesquisadora (2019).

Todas as aplicações foram realizadas de forma pontual, posicionada perpendicularmente sobre a superfície de tratamento na região do nervo infraorbital dos animais. Os aplicadores e os animais usaram óculos de proteção ocular com filtro de proteção ocular para laser infravermelho invisível com comprimento de onda de 830 a 970 nm e também óculos com comprimento de onda de 630 a 750 nm para *laser* vermelho visível, com atenuação máxima de 95 % para garantir a saúde ocular e lesões na retina.

O experimento foi realizado nos grupos do laser vermelho e infravermelho. Nos grupos que havia associação com a metformina, os mesmos foram aplicados 30 minutos após a aplicação da mesma.

6.8 Avaliação da expressão de mTOR e ATF-3 e co-marcação de neurônio através da marcação de NeuN

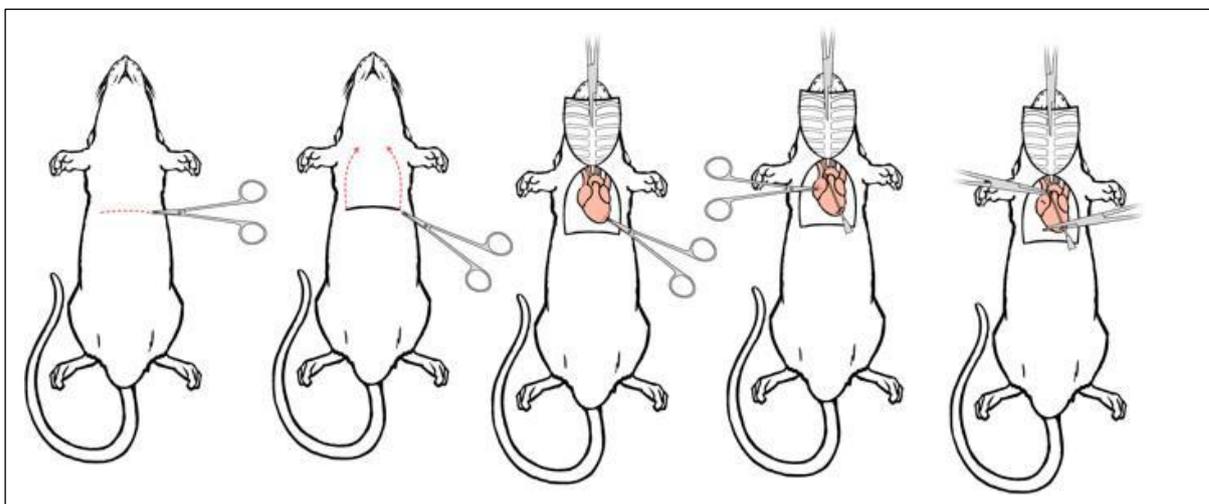
6.8.1 Perfusão cardíaca com uso de Paraformaldeído (PFA)

Para realização do PFA e testes posteriores foram selecionados os seguintes grupos: Controle I, Controle II, Naive, Sham, Metformina I e Metformina II. Os grupos foram selecionados a fim de mostrar o efeito da metformina no efeito nociceptivo após cirurgia do IONX.

Após a realização dos testes, os animais foram anestesiados (8.2) e em seguida posicionados em uma tábua vazada acoplada a pia `zfoi realizada uma incisão lateral de 5 a 6 cm através do tegumento e da parede abdominal bem abaixo da caixa torácica. O fígado foi separado cuidadosamente do diafragma.

Em seguida, outra pequena incisão foi realizada no diafragma usando a tesoura curva e sem corte (Figura 18). O corte seguiu por toda a extensão da caixa torácica para expor a cavidade pleural. Uma tesoura romba foi acoplada ao longo de um dos lados das costelas, deslocando cuidadosamente os pulmões e um corte na caixa torácica foi realizado até a clavícula.

Figura 18: Descrição do preparo do animal para perfusão.



Fonte: Gage, Kipk; Shain (2012).

Da mesma forma foi feito no lado contralateral. Posteriormente, levantou-se o esterno, e cortou com cuidado qualquer tecido que o conecte ao coração. Uma pequena incisão foi realizada na extremidade posterior do ventrículo esquerdo. Uma agulha de perfusão de 15 gauge foi passada através do ventrículo cortado para a aorta ascendente. Por fim, realizou-se uma incisão no átrio direito do animal usando uma tesoura de íris para criar a maior saída possível sem danificar a aorta descendente. Neste ponto, o animal estava pronto para ser perfundido transcárdicamente com paraformaldeído 4 % em tampão fosfato (0,1 M; pH 7,4).

6.8.2 Extração dos núcleos espinhais trigeminais (SP5C) e gânglio trigeminal

Após, o animal estar completamente perfundido, o cérebro foi retirado, os tecidos remanescentes foram removidos e toda a região adjacente foi limpa cuidadosamente até avistar o cérebro do animal que foi acomodado em um bloqueador de cérebro de rato (Figura 19 a, b), a fim de corresponder aos planos do atlas de Paxinos e Watson (1986) para realização de cortes de tecido cerebral, em que o mesmo é encaixado e cada região corresponde a uma porção específica do tecido cerebral, de acordo com o plano estereotáxico do cérebro do rato em coordenadas estereotáficas. (Figuras 20 e 21).

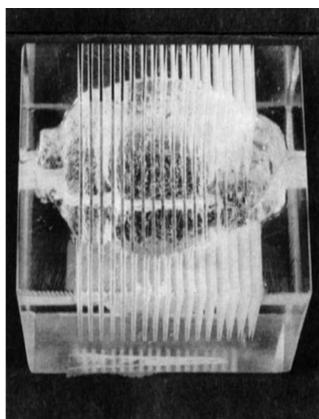
Figura 19 (a, b). Acomodação do cérebro no bloqueador cerebral.



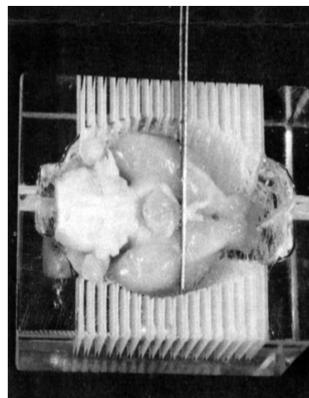
Fonte: Acervo da pesquisadora (2019).

Figura 20. The Brain bloker.

Figura 21. Lâmina para corte no bloqueador.



Fonte: Watson e Paxinos (1989).



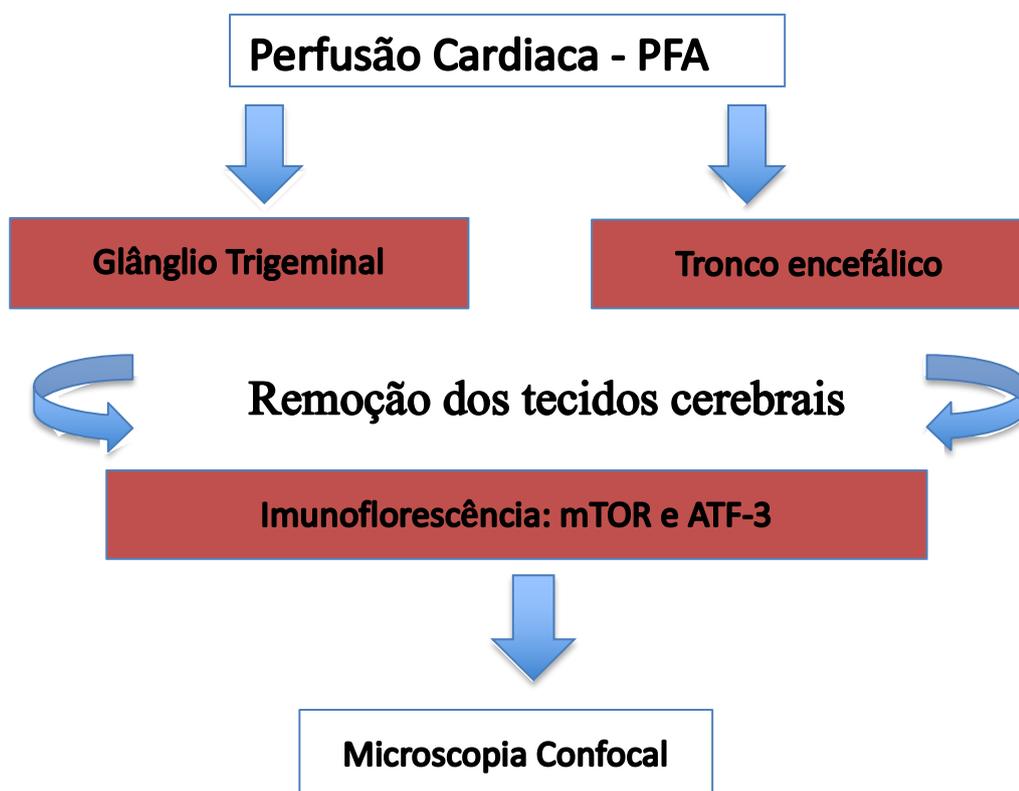
Fonte: Watson e Paxinos (1989).

As fatias cerebrais são cortadas com auxílio de lâminas de barbear (Figura 22). O cérebro foi removido, e o tronco encefálico e gânglio trigeminal esquerdo foram

separados. O tronco encefálico foi colocado em caixa de acrílico com molde para o corte com navalha.

Posteriormente, os tecidos foram fixados em PFA 4% por 2h e realizada a crioproteção com solução de sacarose 30% por 72h. Os tecidos foram congelados por meio de tissue tek e cortados com criostato a -20°C na espessura de 10 micrômetros. Após foram armazenados a temperatura de -80°C para posterior marcação por imunofluorescência para mTOR e ATF-3 e observação em microscópio confocal (Figura 22).

Figura 22: Desenho esquemático para ensaio de imunofluorescência de glânglio trigeminal e tronco encefálico.



Fonte: Elaborado pela autora (2019).

6.8.3 Preparo das lâminas com uso do criostato

Foi utilizado o criostato para confeccionar cortes de tecidos que foram congelados. De acordo com Molinato, Caputo e Amendoeira (2010) esse equipamento consiste de um micrótomo rotatório acondicionado dentro de uma câmara frigorífica

com temperatura - 20°C. O sistema desse micrótomo é usado para blocos com fragmentos grandes, podendo ser utilizado para bloco de gelatina ou parafina. É um micrótomo bastante pesado, de modo que evita qualquer tipo de vibração mecânica. Muito utilizado para a confecção de cortes de tecido nervoso.

6.8.4 Imunofluorescência de tecido extraído do trato espinhal do trigêmeo, do gânglio trigeminal

Foi realizado ensaio de imunofluorescência específico para a detecção da expressão de mTOR e ATF-3 e co-marcação de neurônio através da marcação de NeuN. Para isso, os cortes histológicos foram submersos em metanol por 2 minutos, lavado em seguida com tampão trifosfato (PBS) e feita recuperação antigênica em tampão citrato, sob aquecimento em banho maria (95°C), por 18 minutos. Após o resfriamento, obtido em temperatura ambiente durante 20 minutos, foram feitas lavagens com solução tamponada de fosfato (PBS).

Realizou-se bloqueio para ligações específicas com solução de glicina e BSA 5%, por 30 min e posterior lavagem com PBS por 5 minutos. Os cortes foram incubados “*overnight*” (4°C) com os anticorpos primários m-TOR e ATF-3. Após lavagens, os cortes foram incubados com anticorpo secundário por 1 h e 30 min (Alexa Flúor® 594 ou 488). Estudos de controle de imunomarcação foram realizados por omissão dos anticorpos primários (controle negativo). Dupla marcação foi realizada simultaneamente com dois anticorpos primários obtidos de espécies diferentes. Para diferenciação de neurônios foi utilizado o anticorpo fluorescente anti-NeuN por imunofluorescência direta (conjugado a Alexa fluor® 488). Alguns cortes foram ainda incubados com o marcador nuclear DAPI durante 30 min.

Após lavagens, todas as seções foram montadas em *Prolong Gold*® e as imagens foram coletadas sequencialmente usando microscópio de varredura a laser confocal. A quantificação da área marcada nas fotos foi realizada diferenciando as áreas marcadas (pixels) pela maior saturação de cor associada à marcação (vermelha ou verde).

Para isso, foi utilizado o programa Fuji Image J – NIH. O procedimento foi baseado na saturação da cor associada à marcação positiva para um determinado marcador. Os limites necessários para definição de pixels marcados e não marcados

foram definidos previamente e padronizados para cada grupo de marcadores utilizados. A área marcada foi determinada em percentagem.

6.9 Análise estatística

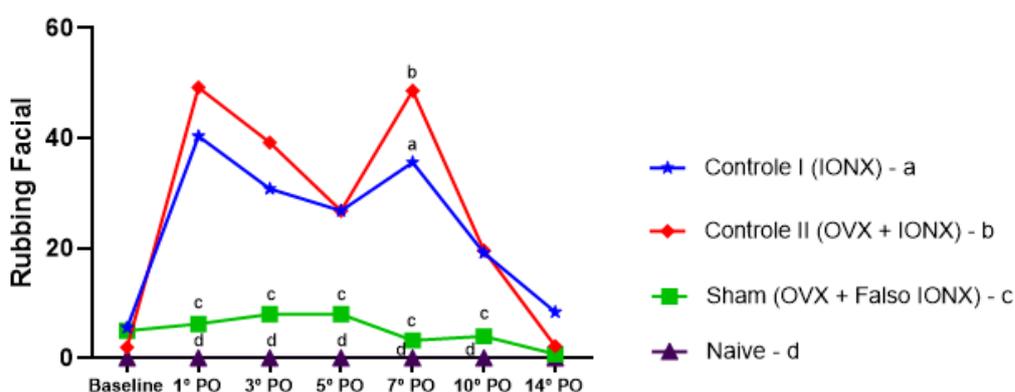
Os dados obtidos foram analisados com o auxílio do programa *Graph Prism 8.0* para *MacBook* (EUA). A comparação entre as médias foi realizada empregando-se a análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Bonferroni e *t de student* para avaliar 2 grupos. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o nível de significância foi de 5% ($p < 0,05$), assinalando-se com o símbolo [*] os valores significantes nas comparações inter-grupais.

7 RESULTADOS

7.1 Avaliação da nociceção orofacial neuropática em ratas ovariectomizadas e não ovariectomizadas

A transecção do nervo infraorbital (IONX) provocou hipersensibilidade ao frio nas ratas não ovariectomizadas (não-OVX) e ovariectomizadas (OVX) desde o 1º dia pós-operatório até o 7º dia, em comparação aos grupos sham e naive (Gráfico 1a, 1b). No 7º dia pós-operatório, as ratas OVX apresentaram número de maior de comportamentos nociceptivos (**p < 0,01) em relação ao grupo submetido somente à cirurgia IONX (Gráfico 1).

Gráfico 1: Avaliação da nociceção orofacial neuropática em ratas ovariectomizadas e não ovariectomizadas.



a ** 7º PO. **p<0,01 vs controle II (OVX + IONX)

b ** 7º PO. **p<0,01 vs controle I (IONX)

c **** 1º PO; 3º PO, 5º PO, 7º PO. *** 10º PO. ***p<0,001; ****p<0,0001 vs controle II (OVX + IONX)

d **** 1º PO; 3º PO, 5º PO, 7º PO; 10º PO. ****p<0,0001 vs controle I (IONX) vs controle II (OVX + IONX)

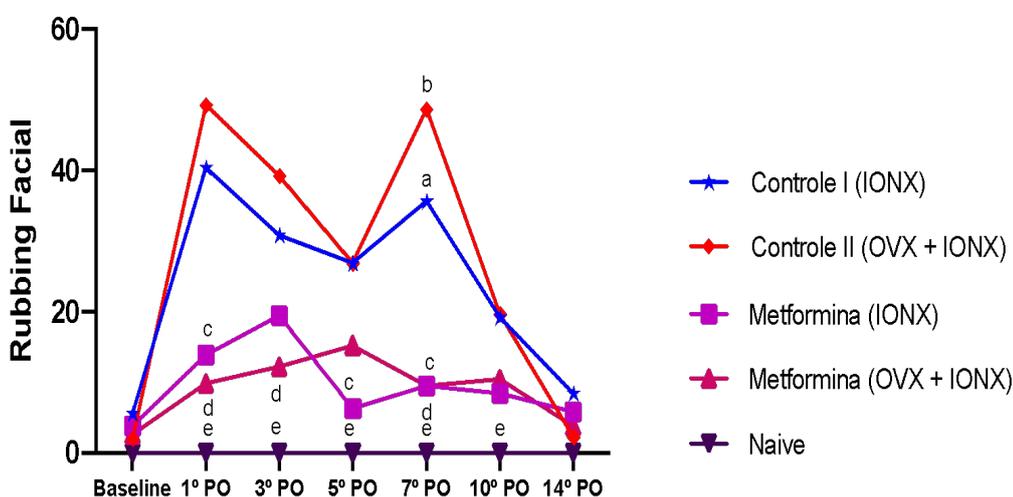
Os resultados representam as médias do número de comportamentos de *rubbing facial* durante 60 segundos e são apresentados como média ± erro padrão da média (EPM) para 6 animais/grupo. a** p<0,01 vs controle II (OVX + IONX); no 7º dia; b** p<0,01 vs controle I (IONX) no 7º dia; c *** p<0,0001 Controle II vs Sham nos 1º, 3º, 5º, 7º e *** p<0,001 no 10º dia; d **** p<0,0001 Controle I e Controle II vs Naive (OVX + IONX) do 1º ao 10º. (ANOVA seguida de Bonferroni). OVX –

ovariectomia; IONX – transecção do nervo infraorbital.

7.2 Avaliação do efeito antinociceptivo orofacial neuropático da metformina em ratas normais e ovariectomizadas

As ratas OVX e não-OVX tratadas com metformina apresentaram menor número de comportamentos nociceptivos, quando comparadas aos animais dos grupos Controle OVX e Controle OVX+IONX até o 7º dia pós-operatório (Gráfico 2).

Gráfico 2: Avaliação do efeito antinociceptivo orofacial neuropático da metformina em ratas ovariectomizadas e não ovariectomizadas (comparados com os grupos Controle).

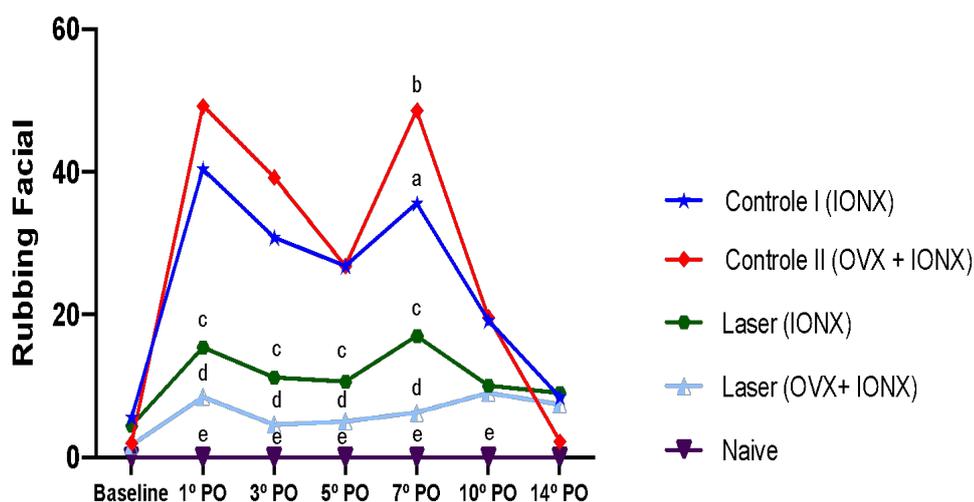


Os resultados representam as médias do número de comportamentos de *rubbing facial* durante 60 segundos e são apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM) para 6 animais/grupo. a** $p < 0,05$ vs controle II (OVX + IONX); no 7º dia; b** $p < 0,05$ vs controle I (IONX) no 7º dia; c *** $p < 0,0001$ MET I vs Controle I nos 10, 50, 70, 70 dias; d **** $p < 0,0001$ MET II vs Controle II (OVX + IONX) nos 10, 30, 70 dias; e **** $p < 0,0001$ Naive vs controle I (IONX) e controle II (OVX + IONX) do 10 PO ao 100 PO. (ANOVA seguida de Bonferroni). OVX – ovariectomia; IONX – transecção do nervo infraorbital.

7.3 Avaliação do efeito antinociceptivo orofacial neuropático do laser vermelho em ratas normais e ovariectomizadas

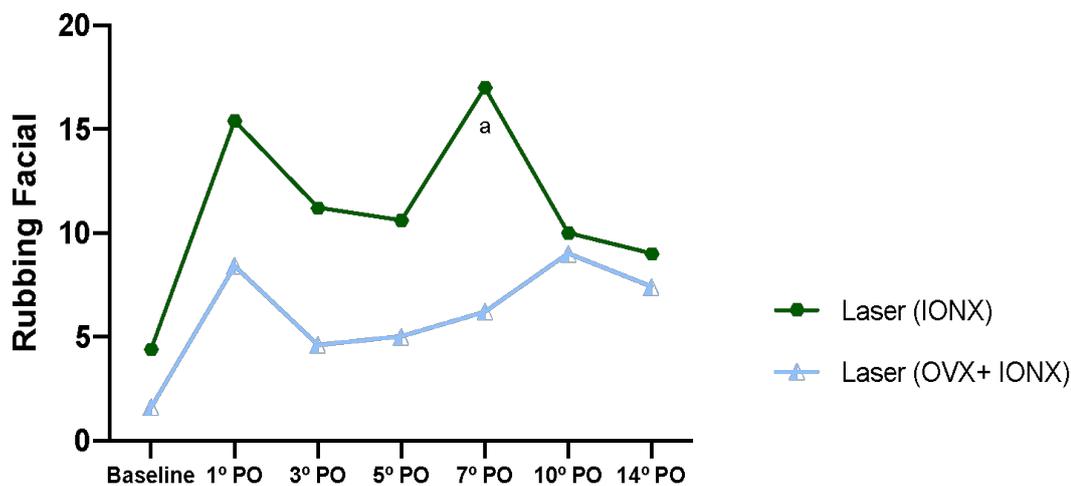
As ratas OVX e não-OVX tratadas com laser vermelho apresentaram menor número de comportamentos nociceptivos, quando comparadas aos animais dos grupos Controle OVX e Controle OVX+IONX até o 7º dia pós-operatório (Gráfico 3 e 4). Não houve diferença entre os grupos de ratas OVX e não-OVX tratadas com laser vermelho, exceto no 7º dia pós-operatório quando as ratas OVX diminuíram os comportamentos nociceptivos em relação grupo não-OVX (**** $p < 0,0001$).

Gráfico 3: Avaliação do efeito antinociceptivo orofacial neuropático do laser vermelho em ratas ovariectomizadas e não ovariectomizadas.



Os resultados representam as médias do número de comportamentos de *rubbing facial* durante 60 segundos e são apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM) para 6 animais/grupo. a** $p < 0,05$ vs controle II (OVX + IONX); no 7º dia; b** $p < 0,05$ vs controle I (IONX) no 7º dia; c **** $p < 0,0001$ LASER vs Controle I (IONX) nos 1º, 3º, 7º dias e *** $p < 0,001$ no 5º PO; d **** $p < 0,0001$ LASER vs Controle II (OVX + IONX) nos 1º, 3º, 5º, 7º dias; e **** $p < 0,0001$ NAIVE vs controle I (IONX) e controle II (OVX + IONX) do 1º PO ao 10º PO. (ANOVA seguida de Bonferroni). OVX – ovariectomia; IONX – transecção do nervo infraorbital.

Gráfico 4: Avaliação do efeito antinociceptivo orofacial neuropático do laser vermelho em ratas ovariectomizadas e não ovariectomizadas.

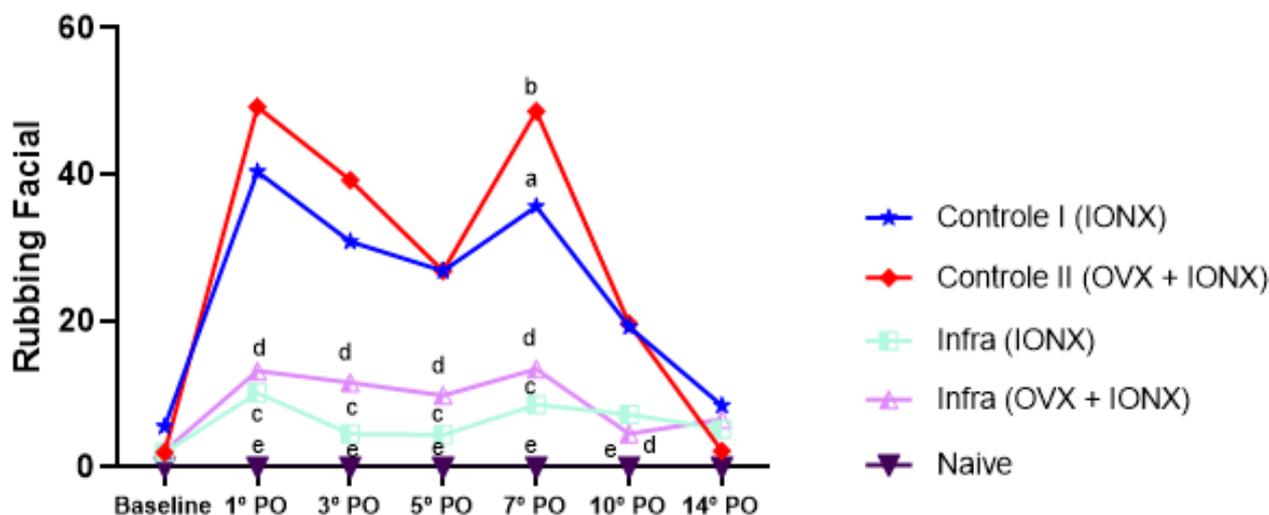


Os valores representam a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) para 6 animais/grupo. $a^{**} p < 0,05$ vs Laser II (OVX + IONX) no 70 dia. (ANOVA seguida de Bonferroni). OVX – ovariectomia; IONX – transecção do nervo infraorbital.

7.4 Avaliação do efeito antinociceptivo orofacial neuropático do laser infravermelho em ratas normais e ovariectomizadas

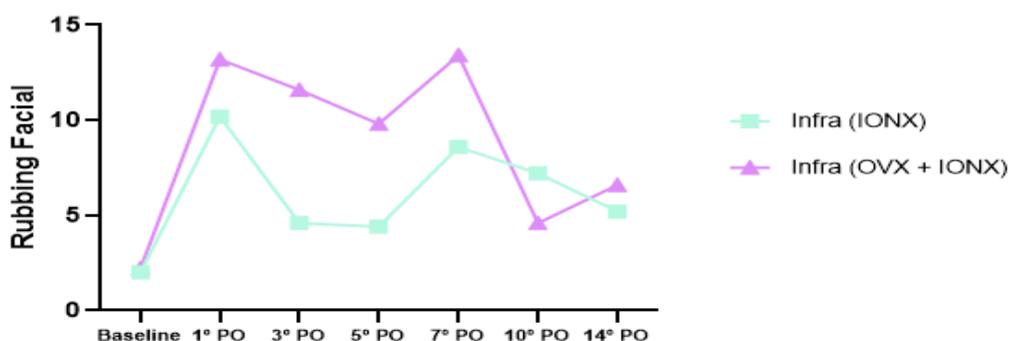
As ratas OVX e não-OVX tratadas com laser infravermelho apresentaram menor número de comportamentos nociceptivos, quando comparadas aos animais dos grupos Controle OVX e Controle OVX+IONX até o 7º dia pós-operatório (Gráfico 5). Não houve diferença entre os grupos de ratas OVX e não-OVX tratadas com laser infravermelho, exceto no 7º dia pós-operatório quando as ratas não-OVX diminuíram os comportamentos nociceptivos em relação grupo OVX ($****p < 0,0001$) (Gráfico 6).

Gráfico 5: Avaliação do efeito antinociceptivo orofacial neuropático do laser infravermelho em ratas ovariectomizadas e não ovariectomizadas (comparados aos grupos controles).



Os resultados representam as médias do número de comportamentos de *rubbing facial* durante 60 segundos e são apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM) para 6 animais/grupo. a** $p < 0,05$ vs controle II (OVX + IONX) no 7º dia; b** $p < 0,05$ vs controle I (IONX) no 7º dia; c **** $p < 0,0001$ INFRA vs Controle I (IONX) nos 1º, 3º, 5º, 7º dias; d **** $p < 0,0001$ INFRA vs Controle II (OVX + IONX) nos 1º, 3º, 7º dias, *** $p < 0,001$ no 5º PO e ** $p < 0,001$ no 10º PO e **** $p < 0,0001$ Naive vs controle I (IONX) e controle II (OVX + IONX) do 1º PO ao 10º PO. (ANOVA seguida de Bonferroni). OVX – ovariectomia; IONX – transecção do nervo infraorbital.

Gráfico 6: Avaliação do efeito antinociceptivo orofacial neuropático do laser infravermelho em ratas ovariectomizadas e não ovariectomizadas.



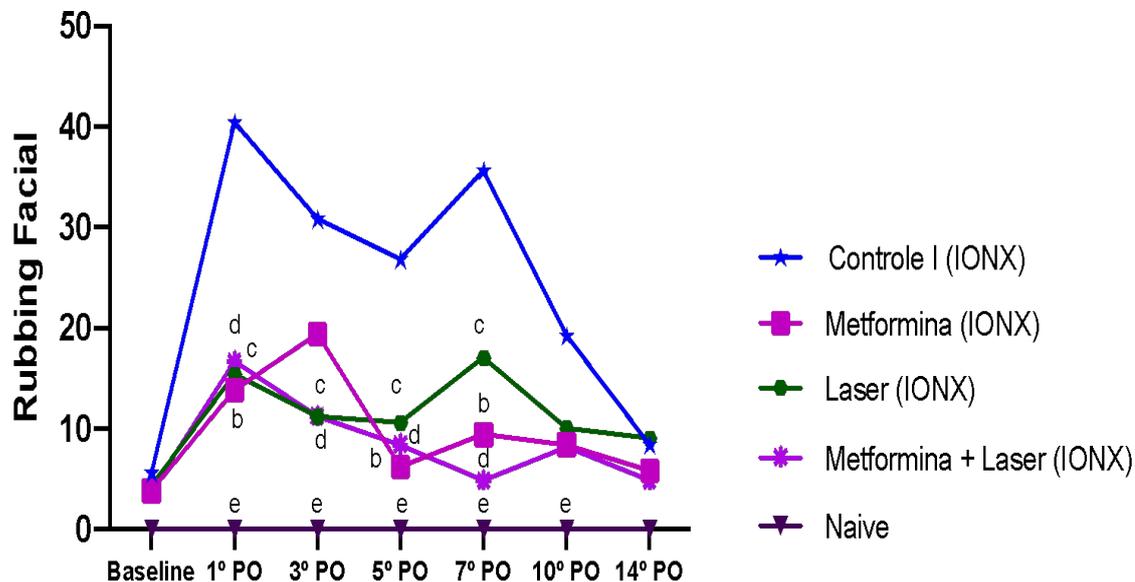
Os resultados representam as médias do número de comportamentos de *rubbing*

facial durante 60 segundos e são apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). Os grupos foram comparados entre si. Não houve relevância significativa entre os grupos.

7.5 Avaliação do efeito antinociceptivo orofacial neuropático da associação entre metformina e laser vermelho em ratas normais e ratas ovariectomizadas

As ratas OVX e não-OVX tratadas com a associação de metformina e laser vermelho apresentaram menor número de comportamentos nociceptivos (**** $p < 0,0001$), quando comparadas aos animais dos grupos Controle OVX e Controle OVX+IONX até o 10º dia pós-operatório (Gráficos 7 e 9). No entanto, não houve diferença entre os tratamentos isolados (metformina e laser vermelho) e a associação destes (metformina + laser vermelho) (Gráficos 8 e 10).

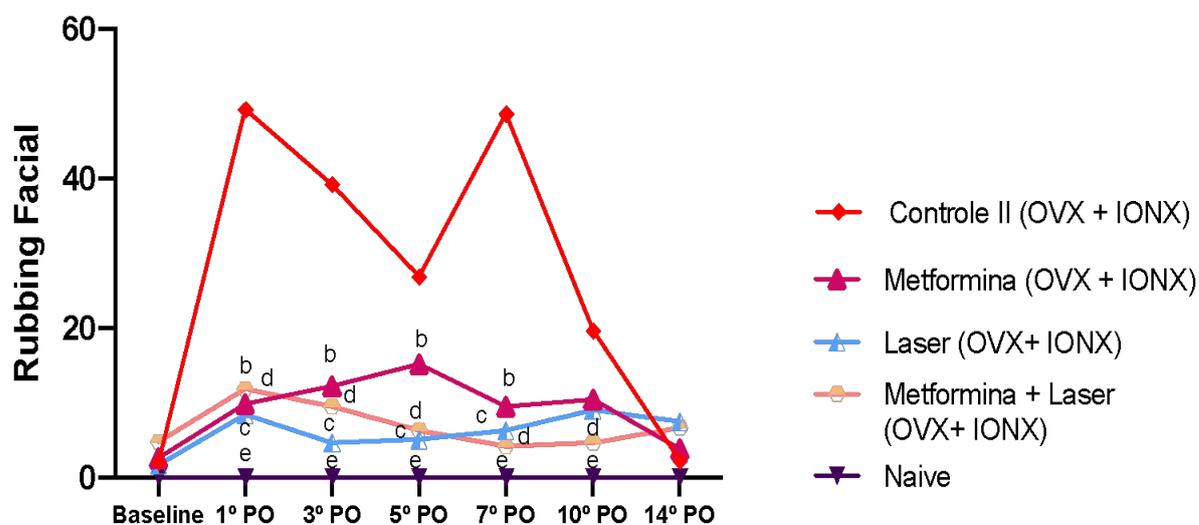
Gráfico 7: Avaliação do efeito antinociceptivo orofacial neuropático da associação entre metformina e laser vermelho em ratas normais (comparadas aos grupos Controle).



Os resultados representam as médias do número de comportamentos de *rubbing facial* durante 60 segundos e são apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM) para 6 animais/grupo. b **** $p < 0,0001$ vs controle I (IONX) nos 1º, 5º e 7º dia; c **** $p < 0,0001$ LASER vs Controle I (IONX) nos 1º, 3º e 7º dias de PO e *** $p < 0,001$ no 5º PO; d **** $p < 0,0001$ LASER vs Controle I (IONX) nos 1º, 3º, 5º, 7º

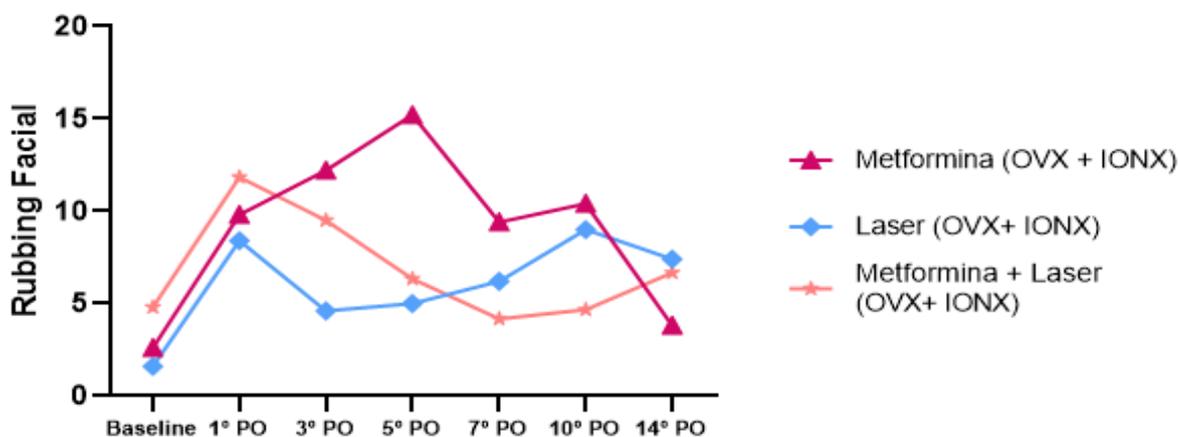
dias e **** $p < 0,0001$ Naive vs controle I (IONX) do 1^o PO ao 10^o PO. (ANOVA seguida de Bonferroni). OVX – ovariectomia; IONX – transecção do nervo infraorbital.

Gráfico 8: Avaliação do efeito antinociceptivo orofacial neuropático da associação entre metformina e laser vermelho em ratas ovariectomizadas (comparadas aos grupos Controle).



Os resultados representam as médias do número de comportamentos de *rubbing facial* durante 60 segundos e são apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM) para 6 animais/grupo. b **** $p < 0,0001$ MET II vs Controle II (OVX + IONX) nos 1^o, 3^o, 7^o dias e * $p < 0,05$ no 5^o PO; c **** $p < 0,0001$ LASER vs Controle II (OVX + IONX) nos 1^o, 3^o, 5^o, 7^o dias; d **** $p < 0,0001$ MET + LASER II vs controle II (OVX + IONX) do 1^o PO ao 7^o PO e *** $p < 0,001$ no 10^o PO; e $p < 0,0001$ MET + LASER II vs controle II (OVX + IONX) do 10^o PO ao 7^o PO e **** $p < 0,0001$ Naive vs Controle II (OVX + IONX) do 1^o ao 10^o PO; (ANOVA seguida de Bonferroni). OVX – ovariectomia; IONX – transecção do nervo infraorbital.

Gráfico 9: Avaliação do efeito antinociceptivo orofacial neuropático da associação entre metformina e laser vermelho em ratas ovariectomizadas.



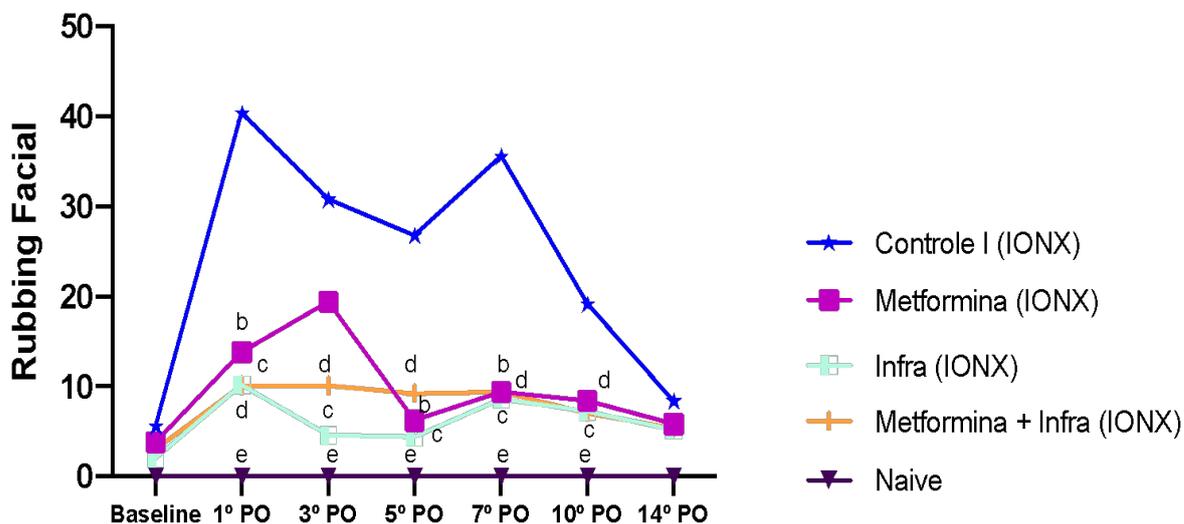
Fonte: Dados da Pesquisa (2019).

Os resultados representam as médias do número de comportamentos de *rubbing facial* durante 60 segundos. Os grupos foram comparados entre si. Não houve relevância significativa entre os grupos.

7.6 Avaliação do efeito antinociceptivo orofacial neuropático da associação entre metformina e laser infravermelho em ratas normais e ratas ovariectomizadas

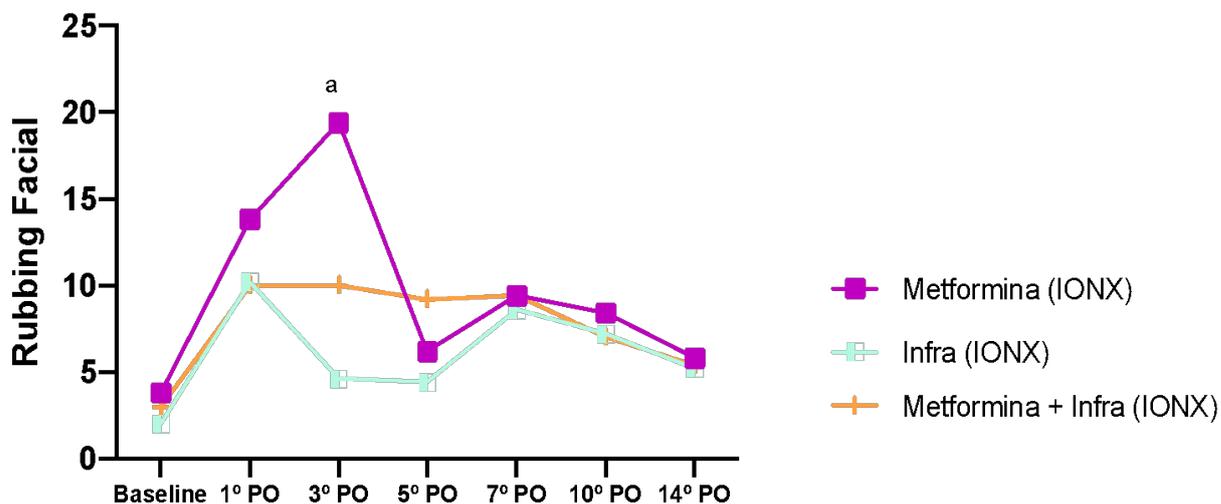
As ratas OVX e não-OVX tratadas com a associação de metformina e laser infravermelho apresentaram menor número de comportamentos nociceptivos (**** $p < 0,0001$), quando comparadas aos animais dos grupos Controle OVX e Controle OVX+IONX até o 10º dia pós-operatório (Gráfico 10 e 12). Houve diferença entre os tratamentos isolados (metformina e laser infravermelho) apresentou relevância significativa no 3º PO (** $p < 0,01$) e a associação destes (metformina + laser infravermelho) apresentaram relação significante (** $p < 0,001$) no 5º PO (Gráficos 11 e 13).

Gráfico 10: Avaliação do efeito antinociceptivo orofacial neuropático da associação entre metformina e laser infravermelho em ratas normais (comparadas aos grupos Controle).



Os resultados representam as médias do número de comportamentos de *rubbing facial* durante 60 segundos e são apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM) para 6 animais/grupo. b **** $p < 0,0001$ MET I vs Controle I (IONX) nos 1^o, 5^o, 7^o dias; c **** $p < 0,0001$ LASER vs Controle I (IONX) nos 1^o, 3^o, 5^o, 7^o dias e * $p < 0,05$ no 10^o PO; d **** $p < 0,0001$ MET + INFRA I vs controle I (OVX + IONX) do 1^o PO ao 7^o PO e *** $p < 0,05$ no 10^o PO; e **** $p < 0,0001$; e **** $p < 0,0001$ Naive vs Controle I (IONX) do 1^o ao 10^o PO; (ANOVA seguida de Bonferroni). OVX – ovariectomia; IONX – transecção do nervo infraorbital.

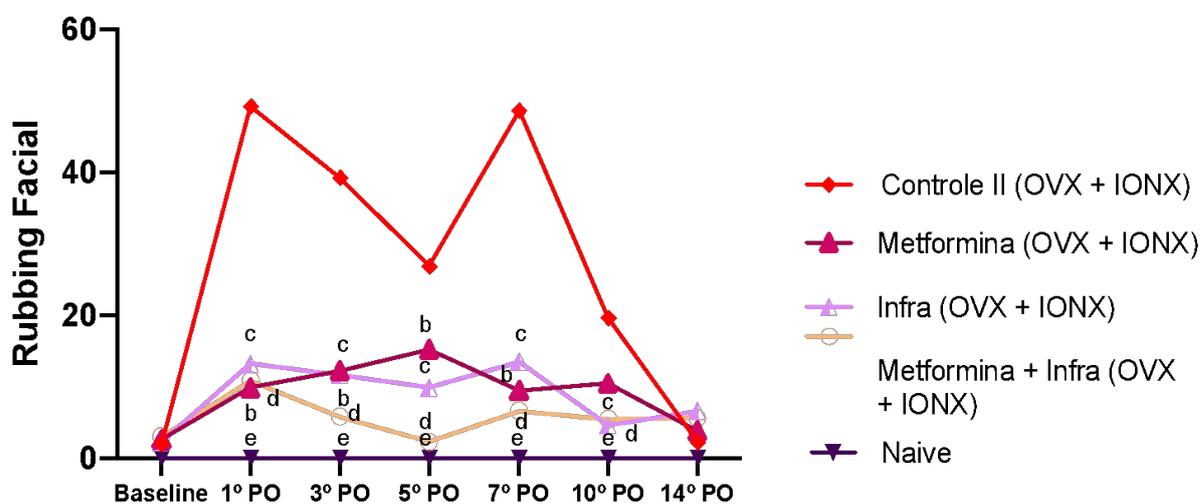
Gráfico 11: Avaliação do efeito antinociceptivo orofacial neuropático da associação entre metformina e laser infravermelho em ratas normais.



Fonte: Dados da Pesquisa (2019).

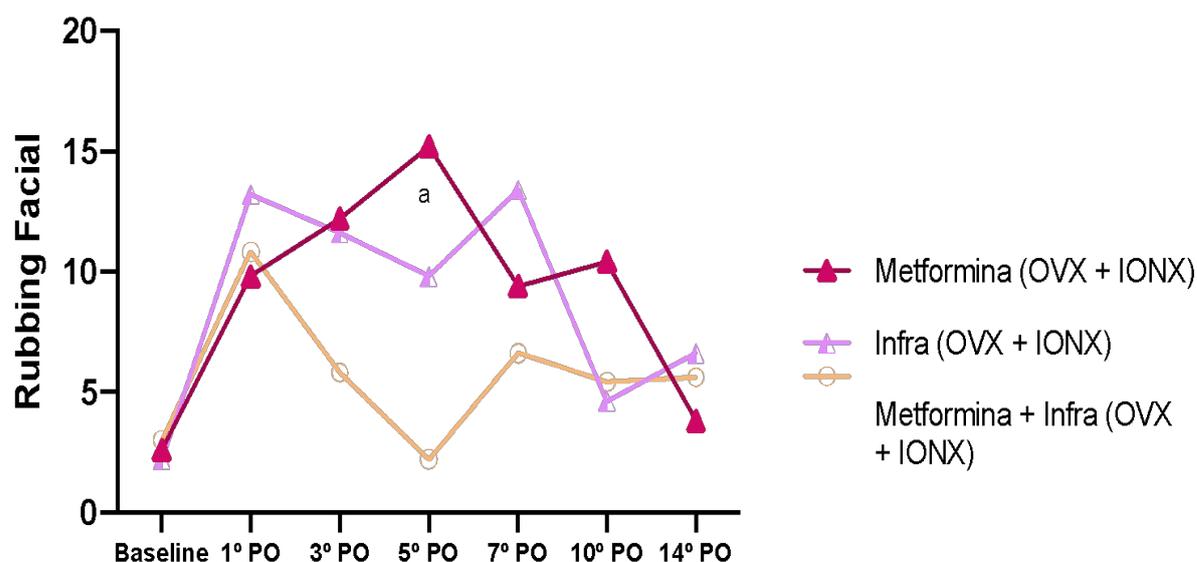
Os resultados representam as médias do número de comportamentos de *rubbing facial* durante 60 segundos e são apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM) para 6 animais/grupo. a ** $p < 0,01$ MET I vs INFRA I (IONX) no 3º dia de PO. (ANOVA seguida de Bonferroni). OVX – ovariectomia; IONX – transecção do nervo infraorbital.

Gráfico 12: Avaliação do efeito antinociceptivo orofacial neuropático da associação entre metformina e laser infravermelho em ratas ovariectomizadas (comparadas aos grupos Controle).



Os resultados representam as médias do número de comportamentos de *rubbing facial* durante 60 segundos e são apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM) para 6 animais/grupo. b **** $p < 0,0001$ MET II vs Controle II (OVX + IONX) nos 1^o, 3^o, 7^o dias e * $p < 0,05$ no 5^o PO; c **** $p < 0,0001$ INFRA II vs Controle II (OVX + IONX) nos 1^o, 3^o, 5^o e 7^o dias e * $p < 0,001$ no 10^o PO; d **** $p < 0,0001$ MET + INFRA II vs controle II (OVX + IONX) do 1^o PO ao 7^o PO e *** $p < 0,05$ no 10^o PO; e $p < 0,0001$; e **** $p < 0,0001$ Naive vs Controle II (OVX + IONX) do 1^o ao 10^o PO; (ANOVA seguida de Bonferroni). OVX – ovariectomia; IONX – transecção do nervo infraorbital.

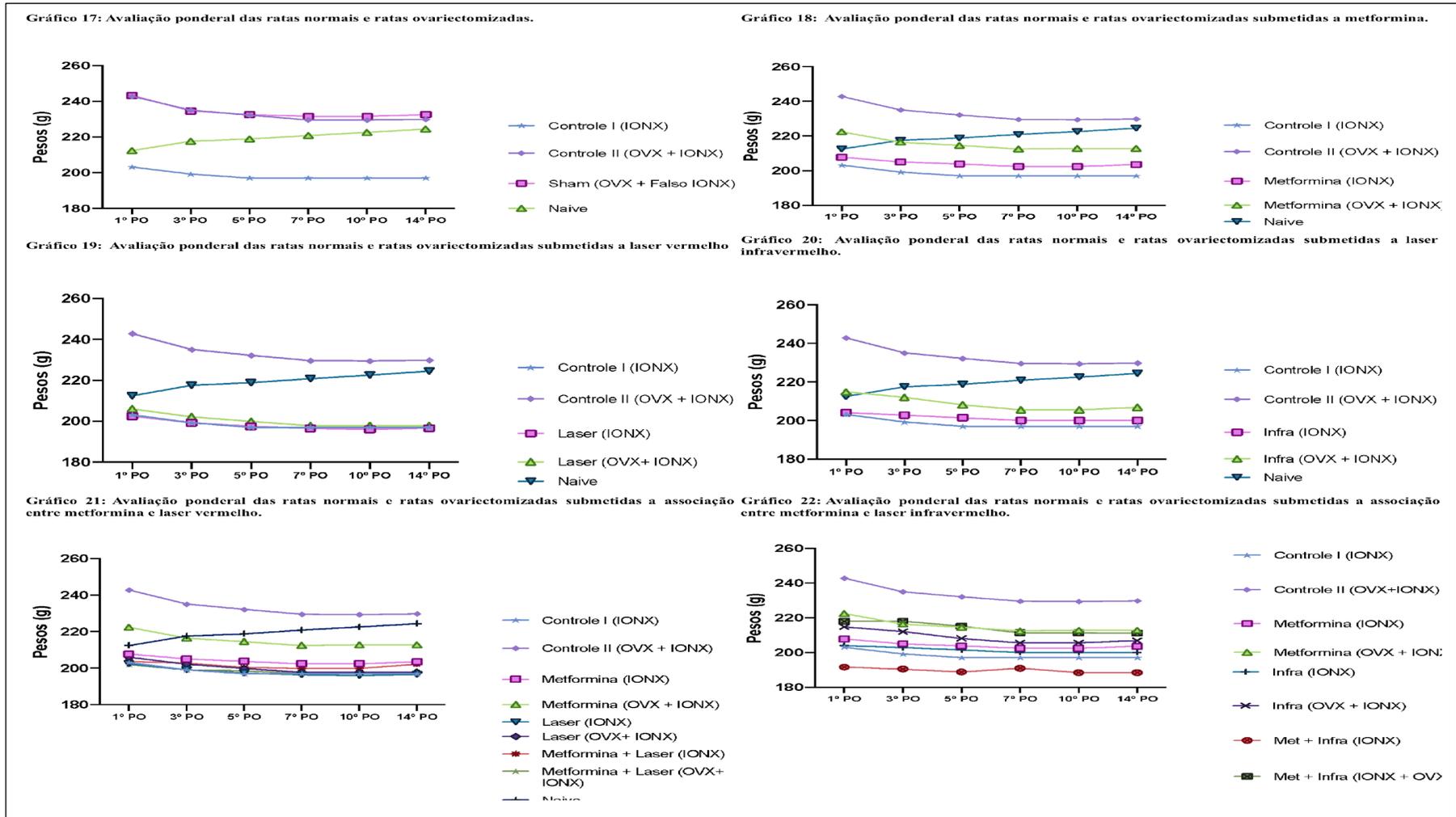
Gráfico 13: Avaliação do efeito antinociceptivo orofacial neuropático da associação entre metformina e laser infravermelho em ratas ovariectomizadas.



a ** 5^oPO, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$ vs Metformina +Infra II (OVX + IONX)

Os resultados representam as médias do número de comportamentos de *rubbing facial* durante 60 segundos e são apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM) para 6 animais/grupo. b ** $p < 0,01$ MET II (OVX + IONX) vs MET II + INFRA II (OVX + IONX) no 5^o PO. (ANOVA seguida de Bonferroni). OVX – ovariectomia; IONX – transecção do nervo infraorbital.

7.7 Avaliação ponderal das ratas

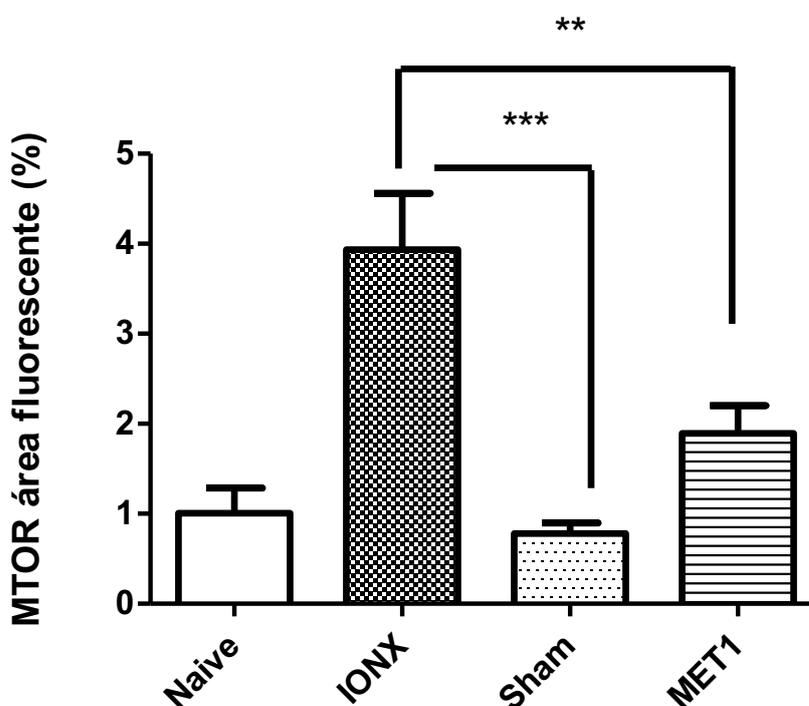


Fonte: Dados do Pesquisa (2019)

7.8 Imunofluorescência para mTOR em tronco encefálico e gânglios trigeminiais, de ratas com dor orofacial.

Conforme pode ser verificado no Gráfico 22, houve aumento da imunoexpressão de mTOR em tronco encefálico e gânglios trigeminiais das ratas submetidas à cirurgia de transecção do nervo infraorbital (IONX) em relação ao grupo Sham ($***p<0,001$). No entanto, o tratamento com metformina (250mg/kg) reverteu esse aumento ($**p<0,001$ vs IONX).

Gráfico 20: Análise quantitativa da imuexpressão para mTOR no tronco encefálico, gânglios trigeminiais, PAG e e tálamo de ratas com dor orofacial submetidas a administração da MET.

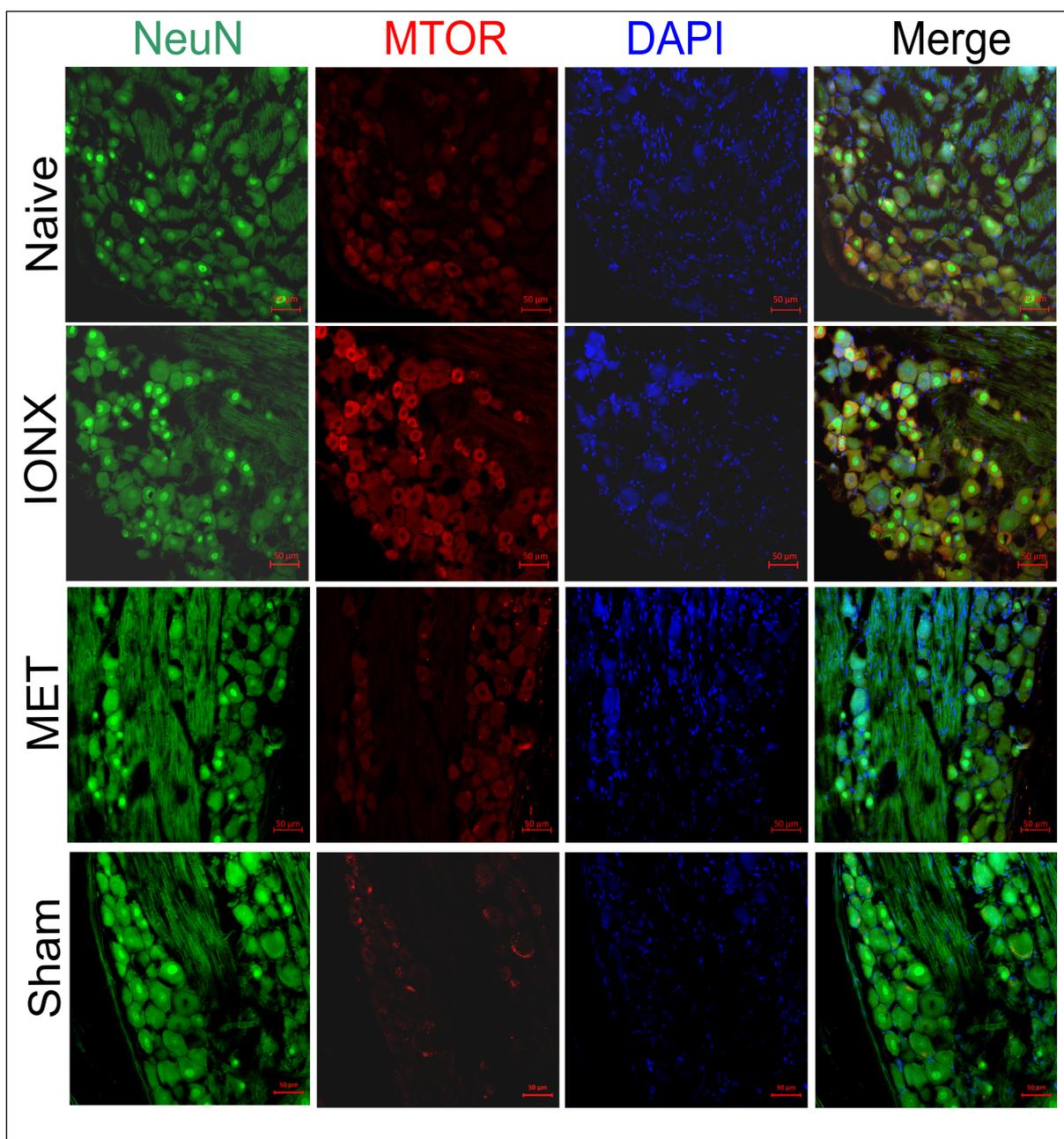


Fonte: Dados da Pesquisa (2019).

Os grupos tratados com MET e o grupo SHAM foram comparados ao grupo IONX. Os tratados com MET relacionados com apresentaram relação significante ($**p<0,001$), assim como o SHAM ($***p<0,0001$).

Foi observado diminuição da imunoexpressão para mTOR nos grupos tratados com MET (250mg/kg) e Sham (FIGURA 23).

Figura 23. Fotomicrografia da imunoexpressão de MTOR no tronco encefálico e gânglios trigeminais de ratas submetidas a administração de MET.

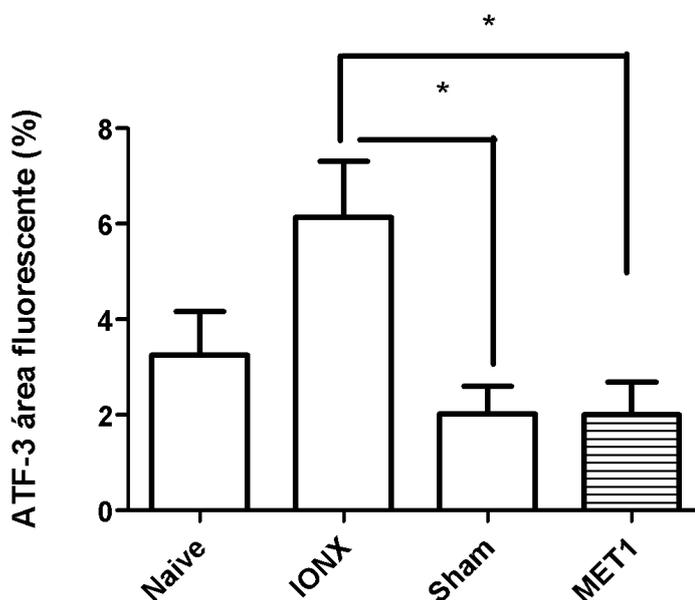


Verde: NeuN (marcador de neurônio); Vermelho; laranja: fusão - Merge; Azul: células em geral (NAPI); Naive: animais normais (Controle); Sham: animais falso operados do IONX; IONX: animais submetidos a cirurgia do nervo infraorbital; MET: metformina. Foto representativa de 1 animal por grupo experimental. Aumento de 200x.

7.9 Imunoflorescência para ATF-3 em tronco encefálico e gânglios trigeminiais de ratas com dor orofacial

Conforme pode ser verificado no Gráfico 23, houve aumento da imunoexpressão de ATF-3 em tronco encefálico e gânglios trigeminiais das ratas submetidas à cirurgia de transecção do nervo infraorbital (IONX) em relação ao grupo Sham (* $p < 0,05$). No entanto, o tratamento com metformina (250mg/kg) reverteu esse aumento (* $p < 0,05$) vs IONX).

Gráfico 21: Análise quantitativa da imunoexpressão para ATF-3 no tronco encefálico e gânglios trigeminiais de ratas com dor orofacial submetidas a administração da MET.

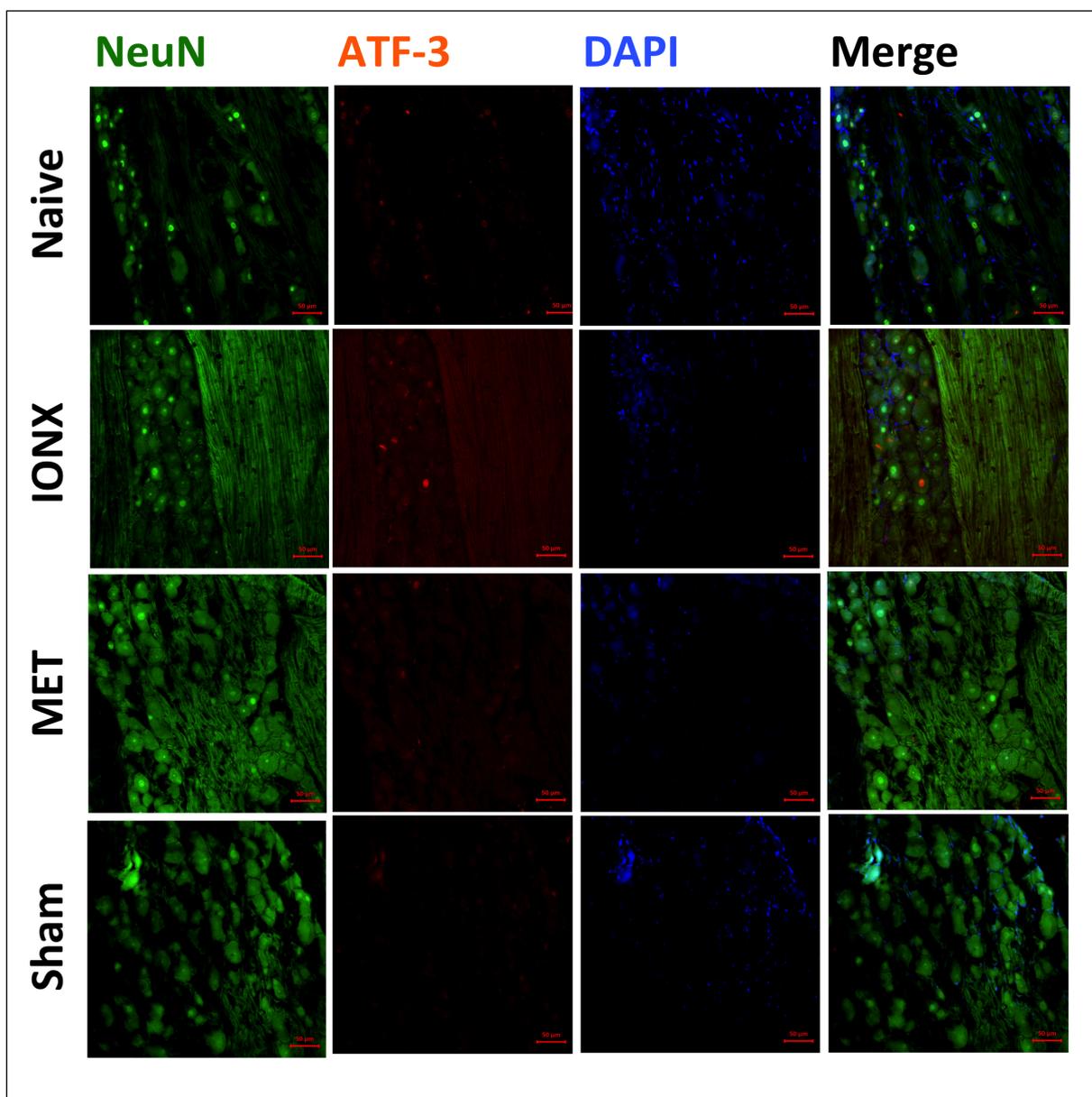


Fonte: Dados da Pesquisa (2019).

Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). Os grupos tratados com MET e o grupo SHAM foram comparados ao grupo IONX. Os tratados com MET relacionados com apresentaram relação significativa (* $p < 0,05$), assim como o SHAM (* $p < 0,05$).

Foi observado diminuição da imunoexpressão para ATF-3 nos grupos tratados com MET (250mg/kg) e Sham (FIGURA 24).

Figura 24. Fotomicrografia da imunoexpressão de ATF-3 no tronco encefálico e gânglios trigeminais, de ratas submetidas a administração de MET.



Verde: NeuN (marcador de neurônio); Vermelho; laranja: fusão - Merge; Azul: células em geral (NAPI); Naive: animais normais (Controle); Sham: animais falso operados do IONX; IONX: animais submetidos a cirurgia do nervo infraorbital; MET: metformina. Foto representativa de 1 animal por grupo experimental. Aumento de 200x.

8 DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo que apresenta o efeito antinociceptivo orofacial neuropático da metformina e da fotobiomodulação em ratas ovariectomizadas.

Os resultados desse estudo apresentam grande importância no que diz respeito aos achados relevantes frente ao tratamento da dor orofacial, por se tratar de dor de caráter crônico e com alta prevalência é considerada caso de Saúde Pública, de modo a acarretar altos danos pessoais e socioeconômicos. Sendo assim, necessário quantificar os custos para a sociedade, assim como o impacto desta nas relações interpessoais, nas restrições das atividades de trabalho, na convivência familiar e na vida social, buscando, assim, tratamentos eficazes e de baixo custo (VON KORFF; DWORKIN; LE RESHE, 1990; ROSSETO *et al.*, 1999).

No que diz respeito, aos achados clínicos mais comuns da dor orofacial apresentam caráter multifatorial, decorrentes de diversos fatores categorizados em traumas, fatores psicossociais e fatores fisiopatológicos. Os fatores culturais, econômicos, sociais, religiosos e geográficos também influenciam a etiologia das lesões craniomaxilofaciais no mundo. Sendo assim, se torna necessário e de extrema importância conhecer sobre a doença, tratamentos efetivos e a prevenção dessas lesões. Sendo assim, a metformina e a fotobiomodulação encaixam-se nesse contexto e se apresentam como uma boa alternativa no tratamento da dor orofacial por se tratarem de uma terapêutica acessível e com resultados eficientes no controle da dor orofacial (GRANJA; LIMA; MACHADO, 2004; SILVA; LIMA; TORRES, 2009).

8.1 Relação do efeito nocieceptivo orofacial em ratas ovariectomizadas e normais

Fejes-Szabó *et al.* (2018) afirmam que existe diferença entre homens e mulheres na percepção à dor e a localização da dor parece amplificar essa diferença, uma vez que essa discrepância é mais acentuada no caso da dor craniofacial, dor temporomandibular e neuralgia do trigêmeo, geralmente mais comum em mulheres. Esses dados indicam que os hormônios sexuais podem influenciar o desenvolvimento de condições de dor trigeminal, no entanto, existem poucos e conflitantes estudos avaliando essa relação.

Portanto, para Beery (2018); Shansky (2019) o que existe, na verdade, é uma crença de que o sexo feminino possui mais variáveis a serem consideradas, em decorrência do ciclo estral ou menstruais em diversas espécies, porém esta já foi desconceituada.

As ratas normais e com hipoestrogenismo submetidas à cirurgia do nervo infraorbital (IONX) apresentaram aumento do número de comportamentos nociceptivos até o 10º dia pós-operatório. No 7º dia pós-operatório, houve aumento do comportamento nociceptivo nas ratas hipoestrogênicas em relação ao grupo de ratas submetidas ao IONX. No entanto, essa diferença não se manteve nas análises posteriores (10º e 14º dias pós-operatório). Esse resultado relatou o aumento da sensibilidade nociceptiva de ratas ovariectomizadas em modelos de nocicepção aguda, tônica e emocional; mas não em modelo de nocicepção crônica (LI *et al.*, 2014).

Segundo Malyshikin, Shekunova e Kashkin (2009) os hormônios sexuais parecem exercer uma função determinante na interferência das diferenças sexuais à percepção da dor, em que o estrogênio surge como um gatilho no comportamento da dor em ratas em períodos de dor inflamatória. Esses mesmo autores verificaram que a sensibilidade ao frio foi maior em ratas normais e ovariectomizadas (tratadas com estradiol) em comparação com ratas ovariectomizadas em modelo de ligação do nervo ciático. O grupo verificou ainda que as ratas normais eram mais sensíveis ao estímulo mecânico do que as ratas ovariectomizadas tratadas com estradiol, levando-os a concluir que a sensibilidade ao frio pode vir a ser parcialmente modulada pelo estradiol.

É importante ressaltar que a ovariectomia está associada a diminuição da transmissão serotoninérgica e opioidérgica, aumento dos níveis de Il-1 β e depleção de progesterona, o que contribui para a hipersensibilidade nociceptiva de início lento e longa duração que pode ser evitada ou revertida pela administração exógena de estrogênio (RYBACZYK *et al.*, 2005; FISCHER *et al.*, 2008; PERCEGONI *et al.*, 2009; SANOJA; CERVERO, 2010).

A complexidade dos possíveis mecanismos envolvidos pode explicar os dados conflitantes sobre o efeito do estrogênio na dor trigeminal e no sistema trigeminal. Nesse estudo, apesar de termos encontrado também uma maior sensibilidade nas ratas OVX, estes foram em momentos pontuais e não durante todo o período de análise, mostrando assim, ainda uma dificuldade de entendimento do mecanismo de ação da

dor frente aos hormônios sexuais femininos (FEJES-SZABÓ *et al.*, 2018).

8.2 Efeito antinociceptivo orofacial neuropático da metformina

A metformina, além do seu efeito hipoglicemiante, também possui potencial para o tratamento das dores neuropáticas. O efeito antinociceptivo orofacial da metformina, tanto em modelo agudo como crônico. Nesse estudo, a metformina reverteu o comportamento nociceptivo induzido pela transecção do nervo infraorbital de forma semelhante nas ratas normais e hipoestrogênicas até o 7º dia pós-operatório (TAYLOR *et al.*, 2013; MAO-YING *et al.*, 2014; MAGALHÃES *et al.*, 2018).

Inyang *et al.* (2019) relataram que a metformina inibe o desenvolvimento da dor neuropática quando o tratamento é administrado na época da lesão e que a metformina é igualmente eficaz na reversão da hipersensibilidade mecânica neuropática quando o tratamento é iniciado semanas após a lesão e este efeito estaria associado a uma inibição da ativação microglial. No entanto, esse efeito da metformina foi observado somente em ratos machos, o que levou os autores a concluir que os efeitos da metformina é específico do sexo.

Essa relação efeito-sexo também foi observada por Ruddy *et al.* (2019). No estudo, os autores concluem que a metformina tem efeito neuroprotetor em ratas, mas não em ratos. Esse efeito seria dependente do estrogênio, já que, nas ratas ovariectomizadas, a metformina não promoveu a mesma expansão das células troncos neuronais verificada nas ratas que receberam estradiol e metformina.

Como o efeito antinociceptivo orofacial neuropático da metformina foi observado tanto em ratas normais como ovariectomizadas, pode-se sugerir que o seu efeito, nessa situação, seria independente do estrogênio. O mecanismo de ação antinociceptivo da metformina ainda não está claro. Vários estudos têm sido publicados, nos anos recentes, com propostas de possíveis mecanismos como modulação da via opióide, ativação da via AMPK no gânglio da raiz dorsal e estimulação do fluxo de autofagia (AUGUSTO *et al.*, 2016; DAS *et al.*, 2019; WENG *et al.*, 2019).

Nesse estudo, observou-se redução da imunexpressão de mTOR e ATF-3 no tronco encefálico e gânglios trigeminiais das ratas tratadas com metformina. Sugerindo

que a metformina tem papel neuroprotetor, visto que esses dois marcadores estão associados ao processo de lesão nervosa e injúria neuronal respectivamente (MELEMEDJIAN *et al.*, 2010; MELEMEDJIAN *et al.*, 2011; TILLU *et al.*, 2012; MELEMEDJIAN *et al.*, 2013; PEREIRA *et al.* 2019).

Resultados semelhantes foram obtidos por Pereira *et al.* (2019), em que a metformina reduziu a expressão de c-Fos e ATF-3 nos gânglios da raiz dorsal, o que indica a prevenção de ativação e dano neuronal. Nesse estudo verificou-se que o ATF-3 é induzido em neurônios sensoriais e motoneurônios na medula espinhal após lesão nervosa e deve ser considerado como um marcador neuronal exclusivo da lesão nervosa no sistema nervoso periférico.

Os efeitos anti-inflamatórios da metformina em vários tipos de células, incluindo células musculares lisas vasculares humanas e células endoteliais, mostrando assim, uma possível correlação também encontrada em nosso estudo com o efeito nociceptivo apresentado pelas ratas (HATORI *et al.*, 2006; ISODA *et al.*, 2006; HUANG *et al.*, 2009).

Com os achados desse estudo acredita-se que devido a MET ter apresentado um papel protetor na indução da expressão de ATF-3 nos gânglios trigeminais e tronco encefálico, hipotetiza-se que efeitos anti-noceptivos da metformina nos macrófagos se devam à indução de ATF-3. Esses resultados também foram observados pelo autor que investigou que o mecanismo anti-inflamatório da metformina foi visto ao usar macrófagos, indizindo as condições inflamatórias pelo tratamento de células com LPS, um produto bacteriano que induz inflamação metabólica *in vivo* (BURCELIN, 2012).

Kim *et al.* (2014) complementa que a MET diminui a produção de citocinas pró-inflamatórias estimuladas por LPS em macrófagos, por meio da regulação positiva da expressão de ATF-3, mostrando que o recente conceito de que a modulação farmacológica da expressão ou ativação do ATF-3 pode oferecer um potencial meio terapêutico para doenças de caráter inflamatório e que hajam lesão tecidual ou neuronal.

Sugere-se que o efeito antinociceptivo orofacial da MET, observado neste estudo, foi conseguido aumentar a sinalização de mTOR e ATF-3, de modo que houve uma maior marcação no trajeto da via de mTOR e de ATF-3, notificando o aumento da excitabilidade do nervo. Sendo assim, observamos que a MTF apresenta efeito

neuronal protetor, levando à um caráter analgésico.

8.3 Avaliação do efeito antinociceptivo orofacial neuropático da fotobiomodulação (laser vermelho e infravermelho)

O efeito analgésico e anti-inflamatório da fotobiomodulação já é comprovado cientificamente, através da inibição parcial da condução nervosa, normalmente em fibras Ad e C e redução da estimulação aferente e da redução do estresse oxidativo e fadiga dos músculos esqueléticos, inibição da transmissão na junção-neuromuscular, reduzindo a sensibilidade no pontos dolorosos e efeitos anti-inflamatórios (LOPES-MARTINS *et al.*, 2006; HAMBLIN *et al.*, 2017; CHOW *et al.*, 2009).

Nesse estudo, a fotobiomodulação reverteu o comportamento nociceptivo induzido pela transecção do nervo infraorbital de forma semelhante nas ratas normais e hipoestrogênicas até o 7º dia pós-operatório. A atenuação da normalmente é alcançado em uma ou duas sessões, principalmente em casos de aguda, como foi o caso do nosso estudo em que a dor foi pós-cirúrgica, de caráter agudo (PROCKT; TAKAHASHI; PAGNONCELLI, 2008).

Eells *et al.* (2004) afirmam que esses fenômenos ocorrem pelos estímulos dos componentes da cadeia respiratória mitocondrial, induzindo a cascata de sinalização, gerando a proliferação celular e citoproteção.

A mitocôndria é receptiva à luz do laser, fazendo com que aumente o metabolismo celular, estimulando as células (leucócitos, fibroblastos, queratinócitos) responsáveis por aumentar o efeito bactericida, proliferação celular e produção de proteínas e citocinas, sendo estes, responsáveis pela cicatrização de feridas, melhoria na microvascularização, regeneração e imunomodulação (EELLS *et al.*, 2004; VLADIMIROV; OSIPOV; KLEBANOV, 2004; SILVEIRA, *et al.*, 2007).

O nosso estudo apresentou resultado positivo no tratamento da dor com a utilização dos lasers vermelho e infravermelho. Estes benefícios acontecem em decorrência da irradiação laser ser capaz de excitar as mitocôndrias celulares, desencadeando um incremento na produção de ATP intracelular; contribuindo, assim, com o metabolismo de ácido araquidônico e a síntese de prostaciclina, fundamentando seu efeito antiedematoso e antiinflamatório, acarretando, então aumento da endorfina

circulante favorecendo a ação analgésica na dor inflamatória (MATERA; TATARUNAS; OLIVEIRA, 2003; MAROVINO, 2004).

A laserterapia de baixa potência atua por meio de ação analgésica local, agindo diretamente na diminuição da inflamação, havendo eliminação de substâncias alogênicas, incentiva uma ação reflexa e desencadeia a produção de substâncias, como a endorfina, no bloqueio da dor. Dessa forma, ocorre aumento da microcirculação local e o aporte sanguíneo nas áreas com tensão muscular. Sendo assim, a laserterapia comporta-se como um coeficiente estabilizador do potencial de membrana em repouso, agindo justamente sobre as terminações nervosas e fazendo com a analgesia haja por mais tempo, confundindo a transmissão do estímulo doloroso local (FIKACKOVA *et al.*, 2006).

O laser de baixa potência é capaz de reduzir a inflamação por meio do decréscimo da degeneração da bainha de mielina e de infiltrados inflamatórios, mostrando, assim que o laser de baixa potência pode possibilitar a redução do processo inflamatório em lesões neuropáticas em ratos, o que reduz os estímulos dolorosos. Esses efeitos fisiológicos foram encontrados em nosso estudo, em que verificamos a redução da dor nas ratas submetidas a cirurgia do IONx e que foram submetidas ao tratamento com laser (GONÇALVES *et al.*, 2013).

Um dos principais achados da dor neuropática é a hipersensibilização, o que também verificamos em nosso estudo que ocorre mudanças na plasticidade do sistema, dando-se perifericamente por diminuição do limiar de ativação dos nociceptores ou de forma central, por meio da responsividade exacerbada da medula espinhal aos estímulos sensoriais. Dessa forma, verificamos que as ratas dos grupos experimentais do nosso estudo apresentaram maior número de coçadas no teste da acetona, mostrando essa hipersensibilização neural (YAN; CHOW; ARMATI, 2011; CORADINI *et al.*, 2014).

Com relação a dosimetria usada, em nosso estudo utilizamos 2J por possuir efeito analgésico e antiinflamatório. Em estudo desenvolvido com 820 pacientes com dor por meio de metanálise verificou que o laser de baixa potência demonstrou boa eficácia em dor aguda e crônica a curto e médio prazo, usando doses que variam de 0,8 a 6J por ponto (CHOW *et al.*, 2009).

Costa (2015) também obteve resultados positivos em estudo desenvolvido com

60 pessoas para redução da dor na musculatura mastigatória usando *laser* de baixa potência com comprimento de onda de 830nm e dose de 2,8J por ponto. Verificou-se redução significativa de dor em cada ponto analisado, corroborando também com os nossos achados.

Tavares; Mazzer; Pastorello (2005) desenvolveram um estudo com 30 ratos da linha Wistar em que todos os animais foram submetidos a tenotomia do tendão do calcâneo direito e foram tratados após 24h até 7 dias e outro grupo até 14 dias com laser 4J/cm². Foi verificado em análise histológica pela microscopia de luz, a presença de células inflamatórias, fibroblastos, vascularização e deposição de colágeno. Dessa forma, pode-se concluir que a terapia a *laser* é capaz de acelerar o processo cicatricial na tenotomia calcânea em ratos, devido ao aumento do depósito de colágeno na fase aguda e tardia do tratamento. Esse estudo também se assemelha com os nossos achados, mesmo embora não tenha sido feito análise histológica para verificar a quantidade de colágeno depositada, houve uma diminuição da dor e inflamação da dor orofacial de ratas. Podendo assim, levar a acreditar que o *laser* possui capacidades analgésicas e anti-inflamatórias.

Em outro estudo desenvolvido por Bertolini *et al.* (2011) com animais que tiveram compressão do nervo isquiático e foram tratados com laser de baixa potência com fluências de 4 J/cm² e 8 J/cm², para redução da dor. Verificaram que quanto maior a fluência maior foi o resultado na redução da dor. Vale ressaltar que apesar dos autores terem usados fluências maiores, em nosso estudo com fluências mais baixas de 2J/cm² também obtivemos resultados satisfatórios na redução da dor local, mostrando que mesmo doses mais baixas também possuem efeito analgésico.

No que diz respeito às fluências usadas do laser terapêutico, ainda são muito controversas e não existe um parâmetro definido de qual seria a melhor opção a ser usada, variando desde doses muito baixas até valores muito altos. Portanto, diferentes fluências conseguem reduzir processos dolorosos, pois atuam em liberação de beta-endorfina, que age diretamente na analgesia (MATERA; TATARUNAS; OLIVEIRA, 2003).

Em estudo mais recente através de uma revisão sistemática, de Pedro *et al.* (2019) verificou que diferentes parâmetros (equipamentos, comprimentos de onda, fluências, potência, áreas de feixe, densidades de potência, tempo de aplicação por

ponto, número de pontos, distância entre pontos, frequência e número de sessões) vêm sendo utilizados para aplicar o LLLT. E ainda evidenciaram, em todos os estudos, que os parâmetros diversos usados, obtiveram uma melhora na sensação de dor, não havendo consenso em uso, no entanto é necessário formar um protocolo para estudos futuros.

As comparações com estudos de laser baixa potência são difíceis, principalmente para dor neuropática, visto que os parâmetros dosimétricos são muito diferentes (BERTOLINI *et al.*, 2011; KHAMSEH *et al.*, 2011).

Quando buscamos notificar qual *laser* obteve melhor resposta, constatamos que tanto o *laser* vermelho quanto o infravermelho apresentaram efeitos parecidos na redução da dor das ratas induzidas a dor neuropática. Porém o *laser* infravermelho, apresentou resultado significativo ($p < 0,0001$) no 100 dia de PO, mostrando que um efeito analgésico mais prolongado. Esses achados fundamentam-se que, em decorrência do seu maior comprimento de onda, em torno de 820-904 nm, o *laser* infravermelho atinge uma maior penetração tecidual, fazendo assim, com que sua irradiação seja mais profunda e conseqüentemente, os efeitos benéficos mais expressivos, sendo então mais efetivos para a analgesia (ÖZDEMIR *et al.*, 2001; HAKGUDER *et al.*, 2003; KREISLER *et al.*, 2003; MATERA *et al.*, 2003; CHOW *et al.*, 2004; GUR *et al.*, 2004; MAROVINO, 2004; NES; POSSO, 2005).

Por se tratar de lasers com respostas parecidas, sugere-se que a preferência de uso em casos de dores neuropáticas se dê pelo *laser* infravermelho, por se tratar uma irradiação com estímulo aos sistemas biológicos, em que ocorre alterações fotoquímicas nos receptores mitocondriais e conseqüentemente, altera o metabolismo celular, desencadeando rotações e vibrações moleculares, atuando nos canais de cálcio (KARU, 1989; RIBEIRO; ZEZELL, 2004).

8.4 Avaliação do efeito antinociceptivo orofacial neuropático da metformina associada a fotobiomodulação

Em nosso estudo, a metformina associada a fotobiomodulação reverteu o comportamento nociceptivo induzido pela transecção do nervo infraorbital de forma semelhante nas ratas nomais e hipoestrogênicas até o 10º dia pós-operatório.

Nesse caso, quando a metformina foi associada ao laser vermelho, estes foram

capazes de reduzir os efeitos nociceptivos no 30 PO e ao associar ao laser infravermelho, este teve uma reversão da dor até o 50 PO, confirmando que a fototerapia laser na faixa do infravermelho é a mais efetiva, em virtude da sua maior profundidade de penetração no tecido, quando comparada com a fototerapia laser emitida no espectro visível da luz (GERBI *et al.*, 2008).

O uso dos lasers de baixa potência possui algumas contraindicações para o seu uso, sendo as mais comuns: neoplasias, visto que o laser por ser um poderoso bioestimulante, pode levar uma replicação do DNA mitocondrial e desencadear metástase, em decorrência do incremento da energia na região da tireoide, pois pode levar a aumento da produção hormonal da glândula tireoide; epilepsia; irradiação na retina, pois pode levar a cegueira; região abdominal e intravaginal em gestantes devido aos possíveis efeitos teratogênicos sobre o feto; pacientes com história de fotossensibilidade ou que façam uso de medicações ou cosméticos fotossensíveis; áreas de hemorragia; na região das gônadas; uso de marcapasso, doenças infecciosas por infecção de *Escherichia coli* e regiões com diminuição de sensibilidade (LOGAN *et al.*, 1994; NAVRATIL; KYMPLOVA, 2000; PINHEIRO *et al.*, 2002).

A metformina, por sua vez, é contraindicada em casos de hipersensibilidade ao cloridrato de metformina ou a qualquer um dos excipientes da formulação; qualquer tipo de acidose metabólica (como acidose láctica, cetoacidose diabética); pré-coma diabético; distúrbios cardíacos e pulmonares; insuficiência renal grave; insuficiência hepática, intoxicação alcoólica aguda, alcoolismo. Em casos de contraindicação do uso da metformina poderá ser usado laser de baixa potência (FDA, 2016).

Em casos que haja contraindicação de uso ou da metformina ou de alguma categoria de laser, seja ele vermelho ou infravermelho faz-se possível o uso do outro recurso como método analgésico, de modo a conseguir obter efeitos analgésicos positivos no controle da dor neuropática, em especial a dor orofacial.

No que diz respeito ao laser e infravermelho, observou-se que os dois recursos terapêuticos apresentaram efeito antinoceptivo tanto em ratas normais quanto ovariectomizadas quando comparadas ao grupo controle. A resposta à dor foi significativa tanto no laser vermelho quanto no infravermelho, no entanto este último apresentou efeito analgésico por mais tempo em decorrência do seu maior comprimento de onda e em consequência, maior penetração tecidual, fazendo com que

haja uma resposta analgésica e inflamatória de maior intensidade.

Quando associados os dois recursos, metformina e laser vermelho e metformina e laser infravermelho notou-se que os comportamentos nociceptivos diminuíram frente aos animais do grupo controle. A associação dos recursos foi potencializada na redução dos efeitos dolorosos quando utilizado em combinação com o laser infravermelho apresentando um efeito mais prolongado quando comparado ao uso do laser vermelho combinado a MET.

9 CONCLUSÃO

O laser vermelho e o infravermelho apresentam efeito antinocepcivo em ratas normais e ovariectomizadas quando comparadas ao grupo controle.

A metformina apresenta efeito neuroprotetor, levando a um caráter analgésico.

A resposta à dor foi significativa nos animais tratados com laser vermelho e infravermelho

O efeito analgésico foi mais prolongado quando utilizado o laser infravermelho

Ratas tratadas com metformina associada ao laser vermelho ou infravermelho apresentaram redução do comportamento nocicepcivo quando comparados ao grupo controle, sendo esse efeito prolongado quando se usa infravermelho.

Há sobreposição de resultados quando usado a associação de metformina e laser vermelho ou infravermelho, de modo que a associação dos recursos foi potencializada na redução dos efeitos dolorosos quando utilizado em combinação com o laser infravermelho apresentando um efeito mais prolongado quando comparado ao uso do laser vermelho combinado a MET.

REFERÊNCIAS

- AAOP. American Board of Orofacial Pain (ABOP). **Definition of orofacial pain dentistry**, 2008. Disponível em: http://www.abop.net/index.asp?Type=B_BASIC&SEC={09420863-3242-4498-8F0D-E60442C8C8E2}. Acesso em: 09 out. 2019.
- AGNE, Jones Eduardo. **Eletrotermofototerapia**. 4. ed. Santa Maria: Sociedade Vicente Pallotti, 2017.
- AGOSTONI, E; FRIGERIO, Roberta; SANTORO, R. Atypical facial pain: clinical considerations and differential diagnosis. **Neurological Sciences**, Milan, v.26, n.Suppl 2, p.s71-74, June 2005.
- AUGUSTO, Paulo Sérgio de Almeida. **Avaliação das atividades da metformina em modelos experimentais de dores nociceptiva, inflamatória e neuropática e inflamação**. 2016. 109 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2016.
- AUSTIN, P.J; MOALEM-TAYLOR, G. The neuro-immune balance in neuropathic pain: involvement of inflammatory immune cells, immune-like glial cells and cytokines. **J Neuroimmunol**, v. 229, n. 1-2, p. 26-50, 2010.
- AVCI, Pinar; VECCHIO, Daniela; PAM, Zeev; PAM, Nadav; HAMBLIN, Michael R. Low-level laser (light) therapy (LLLT) in skin: stimulating, healing, restoring. **Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery**, Philadelphia, v. 32, n.1, p.41-52, Mar. 2013.
- BAAD-HANSEN, Lene. Atypical odontalgia: pathophysiology and clinical management. **Journal of Oral Rehabilitation**. Oxford, v.35, n.1, p.1–11, Feb. 2008.
- BAAD-HANSEN, Lene; LEIJON, Goran; SVENSSON, Peter; LIST, Thomas. Comparison of clinical findings and psychosocial factors in patients with atypical odontalgia and temporomandibular disorders. **Journal of Orofacial Pain**, Amsterdam, v.22, n.1, p.7–14, Feb. 2008.
- BAAD-HANSEN, Lene; PIGG, Maria; IVANOVIC, Susanne El; FARIS, Hanan; LIST, Thomas; DRANGSHOLT, Mark; SVENSSON, Peter. Intraoral somatosensory abnormalities in patients with atypical odontalgia – a controlled multicenter quantitative sensory testing study. **Pain**, Amsterdam, v.154, n.8, p.1287–1294, Aug. 2013.
- BACKONJA, Misha-Miroslav. Use of anticonvulsivants for treatment of neuropathic pain. **Neurology**, New York, v.59, 5 Suppl. 2, p 14-17, Sep. 2002.
- BAILEY, Cliff J.; DAY, Caroline. Metformin: its botanical background. **Practical Diabetes International**, [s.l.], v.21, n.3, p.115-117, 2004.
- BALASUBRAMANIAM, Ramesh; KLASSER, Gary D. Orofacial pain syndromes: evaluation and management. **Medical Clinics of North America**, Philadelphia, v.98, n.6, p.1385-1405, Nov. 2014.

BALTIERI, Danilo Antônio. Opioides: aspectos gerais. In: FOCCHI, Guilherme R. de Azevedo; LEITE, Marcos da Costa; LARANJEIRA, Ronaldo; ANDRADE, Arthur G. **Dependência química: novos modelos de tratamento**. São Paulo: Roca, 2001. p.109-116.

BALTIERI, Danilo Antônio; STRAIN, Eric C.; DIAS, João Carlos; SCIVOLETTO, Sandra; MALBERGIER, André; NICASTRI, Sérgio; JERÔNIMO, Cláudio; ANDRADE, Arthur Guerra de. Diretrizes para o tratamento de pacientes com síndrome de dependência de opióides no Brasil. **Brazilian Journal of Psychiatry**, São Paulo, v.26, n.4, p.259-269, Dez. 2004.

BARATTO, Cesar; SALAMONI, Sabrina Pinto; COSTA, Ricardo; OLIVEIRA, Carolina Borges de; LOCATELLI, Gabriel Olivo. Seleção de microrganismos produtores de enzimas hidrolíticas isolados da região do meio oeste de Santa Catarina, Brasil. **Evidência**, Joaçaba, v.11 n.2, p.15-28, jul./dez. 2011.

BASBAUM, Allan I.; BAUTISTA, Diana M.; SCHERRER, Grégory; JULIUS, David. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, [s.l.], v.139, n.2, p.267–284, Oct. 2009.

BASTOS, João Luiz; GIGANTE, Denise Petrucci; PERES, Karen Glazer. Toothache prevalence and associated factors: a population based study in southern Brazil. **Oral Diseases**, Houndmills, v.14, n.4, p.320-326, May 2008.

BASTOS, Sérgio Borges; ALMEIDA FILHO, Naomar de; SANTANA, Vilma Sousa. Prevalência de cefaléia como sintoma em um setor urbano de Salvador, Bahia. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, São Paulo, v.51, n.3, p.307-312, 1993.

BEERY, Annaliese K. Inclusion of females does not increase variability in rodent research studies. **Current Opinion in Behavioral Sciences**, [s.l.], v.23, p.143–149, Oct. 2018.

BENOLIEL, Rafael; TEICH, Sorin; ELIAV, Eli. Painful traumatic trigeminal neuropathy. **Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America**, Philadelphia, v.28, n.3, p.371–380, Aug. 2016.

BENOLIEL, Rafael; ZADIK, Yehuda; ELIAV, Eli; SHARAV, Yair. Peripheral painful traumatic trigeminal neuropathy: Clinical features in 91 cases and proposal of novel diagnostic criteria. **Journal of Orofacial Pain**, Carol Stream, v.26, n.1, p.49–58, 2012.

BERKLEY, Karen J. Sex differences in pain. **Behavioral and Brain Sciences**, Cambridge, v.20, n.3, p.371- 380, 1997.

BERTOLINI Gladson Ricardo Flor; ARTIFON, Elisângela Lourdes; SILVA, Taciane Stein da; CUNHA, Daniela Martins; VIGO, Priscila Regina. Low-level laser therapy, at 830 nm, for pain reduction in experimental model of rats with sciatica. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, [s.l.], v.69, n.2b, p.356-359, Apr.2011.

BETTONI, Isabella; COMELLI, Francesca; ROSSINI, Clara; GRANUCCI, Francesca. Glial TLR4 receptor as new target to treat neuropathic pain: efficacy of a

new receptor antagonist in a model of peripheral nerve injury in mice. **Glia**, New York, v.56, n.12, p.1312-1319, Sep. 2008.

BJORDAL, Jan Magnus; LOPES-MARTINS, Rodrigo Álvaro Brandão; IVERSEN, Vegard. A randomised, placebo controlled trial of low level laser therapy for activated Achilles tendinitis with microdialysis measurement of peritendinous prostaglandin E2 concentrations. **British Journal of Sports Medicine**, [s.l.], v.40, n.1, p.76-80, Jan. 2006.

BLANCO-AGUILERA, Antonio; BLANCO-HUNGRIA, Antônio Manuel; BIEDMA-VELÁZQUEZ, Lourdes; SERRANO-DEL-ROSA, Rafael; GONZÁLEZ-LÓPEZ, Laura; BLANCO-AGUILERA, Elena; SEGURA-SAINT-GERONS, Rafael. Application of an oral health-related quality of life questionnaire in primary care patients with orofacial pain and temporomandibular disorders. **Medicine Oral, Patologia Oral y Cirurgia Bucal**, Valencia, v.19, n.2, p.e127-135, Oct. 2013.

BORGES, Fabio dos Santos; SCORZA, Flávia Acedo. **Terapêutica em estética: conceitos e técnicas**. São Paulo: Phorte, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de atenção à mulher no climatério / menopausa**. Brasília: Ministério da Saúde, 2008.

BURCELIN, Rémy; GARIDOU, Lucile; POMIÉ, Céline. Immuno-microbiota cross and talk: the new paradigm of metabolic Diseases. **Seminars in Immunology**, [s.l.], v.24, n.1, p.67-74, Feb. 2012.

CAI, Yong; ZHANG, Chun; NAWA, Tigre; ASO, Teijiro; TANAKA, Makiko; OSHIRO, Satoru; ICHIJO, Hidenori; KITAJIMA, Shigetaka. Homocysteine-responsive ATF3 gene expression in human vascular endothelial cells: activation of c-Jun NH2-terminal kinase and promoter response element. **Blood**, Berlin, v.96, n.6, p.2140-2148, Sep. 2000.

CÂMARA, M. L. A. S; CARVALHO, Rejane Andrade de. Processo de reparo. In: PINTO, Leão Pereira. **Patologia básica: sinopse**. Natal: EDUFRRN; 1997. p. 114-123.

CARLTON, Susan M; LEKAN, Helena A; KIM, Sun Ho; CHUNG, Jin Mo. Behavioral manifestations of an experimental model for peripheral neuropathy produced by spinal nerve ligation in the primate. **Pain**, Amsterdam, v.56, n.2, p.155-166, Feb. 1994.

CARRARA, Simone Vieira; CONTI, Paulo César Rodrigues; BARBOSA, Juliana Stuginski. Termo do 1º consenso em disfunção temporomandibular e dor orofacial. **Dental Press Journal of Orthodontics**, Maringá, v.15, n.3, p.114-120, maio/jun. 2010.

CARVALHO, Paulo de Tarso Camilo; MAZZER, Nilton; REIS, Felipe Abdalia dos; BELCHIOR, Ana Carulina Guimarães; SILVA, Iandara Scherttert. Analysis of the influence of low-power HeNe laser on the healing of skin wounds in diabetic and non

diabetics rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, São Paulo, v.21, n.3, p.177-183, May/Jun. 2006.

CAVALCANTI, Maria Oliveira Alves; LIMA, Cacilda Moraes Chaves; LIMA, Júlia Magalhães Costa; GOMES, Irênio; GOLDIM, José Roberto. Prevalência da disfunção temporomandibular em idosos não institucionalizados. **Estudos Interdisciplinares sobre o Envelhecimento**, Porto Alegre, v.20, n.2, p.551-566, 2015.

CHEN, Aaron C.; ARANY, Praveen R.; HUANG, Ying-Ying; TOMKINSON, Elizabeth M.; SHARMA, Sulbha K.; KHARKWAL, Gitika B.; SALEEM, Teimur; MOONEY, David; YULL, Fiona E.; BLACKWELL, Timothy S.; HAMBLIN, Michael R. Low-level laser therapy activates NF- κ B via generation of reactive oxygen species in mouse embryonic fibroblasts. **PLoS One**, San Francisco, v.6, n.7, p.e22453, 2011.

CHOI, Yoon; YOON, Young Wook; NA, Heung Sik; KIM, Sun Ho; CHUNG, Jin Mo. Behavioral signs of ongoing pain and cold allodynia in a rat model of neuropathic pain. **Pain**, Amsterdam, v. 59, n. 3, p. 369–376, 1994

CHOW, Roberta T; BARNSELEY, Leslie; HELLER, Gillian Z; SIDDALL, Philip J. Siddall. A pilot study of low laser therapy in the management of chronic neck pain. **Journal of Musculoskeletal Pain**, [s.l.], v.12, n.2, p.71-81, 2004.

CHOW, Roberta T; JOHNSON, Mark I; LOPES-MARTINS, Rodrigo A.B; BJORDAL, Jan M. Efficacy of low level laser therapy in the management of neck pain: a systematic review and meta-analysis of randomised placebo or active-treatment controlled trials. **The Lancet**, London, v.374, n.9705, p.1897-1908, 2009.

CHRISTOPH, Thomas; DE VRY, Jean; SCHIENE, Klaus; TALLARIDA, Ronald J.; TZSCHENTKE, Thomas M. Synergistic antihypersensitive effects of pregabalin and tapentadol in a rat model of neuropathic pain. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 666, n.1-3, p.72-79, 2011.

CHUNG, Hoon; SHARMA, Sulbha K.; HUANG, Ying Ying; CARROLL, Janes D.; HAMBLIN, Michael R. The nuts and bolts of low-level laser (light) therapy. **Annals Biomedical Engineering**, New York, v.40, n.2, p.516-533, Feb. 2012.

COLLINS, Tucker. Inflamação aguda e crônica. In: COTRAN, Ramzi S.; ABBAS, Abul K.; KUMAR, Vinay; FAUSTO, Nelson. **Robbins: patologia estrutural e funcional**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 44-78.

CONTI, Paulo César Rodrigues; PINTO-FIAMENGUI, Livia Maria Sales; CUNHA, Carolina Ortigosa; CONTI, Ana Cláudia de Castro Ferreira. Orofacial pain and temporomandibular disorders: the impact on oral health and quality of life. **Brazilian Oral Research**, São Paulo, v.26, n.1, p.120-32, 2012.

CORADINI, Josinéia Gresele; MATTJIE, Thiago Fernando; BERNARDINO, Giovanni Ribeiro; PERETTI, Ana Luiza; KAKIHATA, Camila Mayumi Martin; ERRERO, Tatiane Kamada; ERRERO, Assis Roberto Escher; GLADSON, Ricardo Flor Bertolini. Comparação entre o laser de baixa potência, ultrassom terapêutico e

associação, na dor articular em ratos Wistar. **Revista Brasileira de Reumatologia**, Campinas/SP, v.54, n.1, p.7-12, Jan./Fev.2014.

COSTA, Rafael Menezes da. **Disfunção mitocondrial no tecido adiposo perivascular e seu papel nas alterações vasculares em modelo experimental de obesidade**. 2015. 121f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

COSTIGAN, Michael; SCHOLZ, Joachim; WOOLF, Clifford J. Neuropathic pain: A maladaptive response of the nervous system to damage. **Annual Review of Neuroscience**, Palo Alto, v.32, p.1–32, Apr. 2009.

CUSI, Kenneth; DEFRONZO, Ralph A. Metformin: a review of its metabolic effects. **Diabetes Reviews**, Hilverum, v.6, p.89-131, 1998.

CUSTÓDIO, Mathaus Andrey Cândido; FRIAÇA, Elaine Aparecida Borges; TRINDADE, Ana Paula Nassif Tondato. Prevalência de disfunção temporomandibular em estudantes de uma instituição de ensino superior. In: **8º Sim Saúde – Simpósio em Saúde 2017**. Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP, Araçatuba, set. 2017.

DAGSDOTTIR, L.K.; SKYT, Ina; VASE, Lene; BAAD-HANSEN, Lene; CASTRILLON, Eduardo; SVENSSON, Peter O. Reports of perceptual distortion of the face are common in patients with different types of chronic orofacial pain. **Journal of Oral Rehabilitation**, [s.l.], v.43, n.6, p.409–416, Jun. 2016.

DAS, Vaskar; KROIN, Jeffrey S.; MORIC, Mario; McCARTHY, Robert J.; BUVANENDRAN, Asokumar. Antihyperalgesia effect of AMP-activated protein kinase (AMPK) activators in a mouse model of postoperative pain. **Regional Anesthesia & Pain Medicine**, Secaucus, v.44, n.8, June 2019.

DAS, Vaskar; KROIN, Jeffrey S.; MORIC, Mario; McCARTHY, Robert J.; BUVANENDRAN, Asokumar. Early treatment with metformin in a mice model of complex regional pain syndrome reduces pain and edema. **Anesthesia and Analgesia**, Cleveland, Feb. 2019a.

DE CORATO, A; LISI, L; CAPUANO, A; TRINGALI, G; TRAMUTOLA, A; NAVARRA, P et al. Trigeminal satellite cells express functional calcitonin gene-related peptide receptors, whose activation enhances interleukin-1 β pro-inflammatory effects. **J Neuroimmunol**, v. 237, n.1-2, p. 39-46, 2011.

DeFRONZO, Ralph A. Pharmacologic therapy for type 2 Diabetes Mellitus. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v.131, p.281-303, 1999.

DELLAROZA, Mara Solange Gomes; PIMENTA, Cibele Andrucioli de Mattos; MATSUO, Tiemi. Prevalência e caracterização da dor crônica em idosos não institucionalizados. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.23, n.5, p.1151-1160, maio 2007.

DE OLIVEIRA, C. M; SAKATA, R.K; ISSY, A.M; GEROLA, L.R; SALOMÃO, R. Citokines and pain. **Rev Bras Anestesiol**, v. 61, n. 2, p. 260-5, 2011.

DURHAM, Justin; McDONALD, Claire; HUTCHINSON, Luke; NEWTON, Julia L. Painful temporo- mandibular disorders are common in patients with postural orthostatic tachycardia syndrome and impact significantly upon quality of life. **Journal of Oral & Facial Pain and Headache**, Basel, v.29, n.2, p.152-157, 2015.

DZAMKO, Nicolas L.; STEINBERG, Gregory R. AMPK-dependent hormonal regulation of whole-body energy metabolism. **Acta Physiologica**, Oxford, England, v.196, n.1, p.115-127, Mar. 2009.

EELLS, Janis T.; WONG-RILEY, Margaret T.; VERHOEVE, James; HENRY, Michele; BUCHMAN, Ellen V.; KANE, Mary P.; GOULD, Lisa J.; DAS, Rina; JETT, Marti; HODGSON, Brian D.; MARGOLIS, David; WHELAN, Harry T. Mitochondrial signal transduction in accelerated wound and retinal healing by near-infrared light therapy. **Mitochondrion**, Amsterdam, v.4, n.5-6, p.559-567, Sep. 2004.

ELIAV, Eli; HETZBERY, Uri; RUDA, Maryann A.; BENNETT, Gary J. Neuropathic pain from an experimental neuritis of the rat sciatic nerve. **Pain**, Amsterdam, v.83, n.2, p.169-182, Nov. 1999.

EL-TALLAWY, Hamdy N.; FARGHALY, Waffa M.A.; RAGEH, Tarek; SHEHATA, Ghaydaa; HAKEEM, Nabil Abdel; BADRY, Reda; KANDIT, Mahmoud R. Prevalence of trigeminal neuralgia in Al-Quseir city (Red sea Governorate), Egypt. **Clinical Neurology and Neurosurgery**, Assen, v.115, n.9, p.1792-1794, Sep. 2013.

EXAME. **Overdoses por opiáceos atingem níveis recordes nos EUA**. Mar. 2018. Disponível em: <https://exame.abril.com.br/mundo/overdoses-por-opiaceos-atingem-niveis-recordes-nos-eua/>. Acesso em: 09 out. 2019.

FATHABADIE, Fateme Fadaie; BAYAT, Mohammad; AMINI, Abdollah; BAYAT, Maryam; REZAIT, Fateealsadat. Effects os pulsed infrared low level laser irradiation on mast cells number and degranulations in opoen skin wound healingof helathy and streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Cosmetic and Lasrr Therapy**, [s.l.], v.15, n.6, p.294-304, Mar. 2013.

FDA Drug Safety Communication. **FDA revises warnings regarding use of the diabetes medicine metformin in certain patients with reduced kidney function**. 2016. Disponível em: <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-drug-safety-communication-fda-revises-warnings-regarding-use-diabetes-medicine-metformin-certain>. Acesso em: 17 ago. 2019.

FEJES-SZABÓ, Annamária; SPEKKER, Eleonóra; TAR, Lilla; GRÓCZ, Gábor Nagy; BOHÁR, Zsuzsanne; LABORE, Klaudia Flóra; VÉCSEI, Lászió; PÁRDUTZ, Arpad. Chronic 17 β -estradiol pretreatment has pronociceptive effect on behavioral and morphological changes induced by orofacial formalina in ovariectomizes rats. **Journal of Pain Research**, [s.l.], v.2018, n.11, p.2011-2021, Sep. 2018.

FERNANDES, César Eduardo; BACARAT, Edmund Chada; LIMA, G.R. (Eds.). **Climatério**: manual de orientação. São Paulo: Ponto, 2004.

FERREIRA, Flávio B; CRUZ, Lucas M. P; URBAN, Vanessa M; FERNANDES, Fernando; CAMPANHA, Nara Hellen; JORGE, Janaina Habib. Prevalência das

desordens temporomandibulares em graduandos da Universidade Estadual de Ponta Grossa. **Arquivos em Odontologia**, Belo Horizonte, v. 48, n. 1, p. 13-18, Mar. 2012.

FIGUEIREDO, Viviane Maria Gonçalves de; CAVALCANTI, Alessandro Leite; FARIAS, Alcione Barbosa Lira de; NASCIMENTO, Silvio Romero. Prevalência de sinais, sintomas e fatores associados em portadores de disfunção temporomandibular. **Acta Scientiarum, Health Sciences**, Maringá, v.31, n.2, p.159-163, jul./dez. 2009.

FIKACKOVA, Hana; DOSTALOVA, Tatjana; VOSICKA, R.; PETEROVA, V.; NAVRATIL, L.; LESAK, J. Arthralgia of the temporomandibular joint and low-level laser therapy. **Photomedicine and Laser Surgery**, Larchmont, v.24, n.4, p.522-527, 2006.

FILLINGIM, R.B.; GEAR, R.W. Sex differences in opioid analgesia: clinical and experimental findings. **European Journal of Pain**, London, v.8, n.5, p.413-425, Oct. 2004.

FINNERUP, N.B.; JOHANNESSEN, I.L.; SINDRUP, Soren Hein; BACH, Flemming Winther; JENSEN, Troels S. Pain and dysaesthesia in patients with spinal cord injury: a postal survey. **Spinal Cord**, Houndmills, v.39, n.5, p.256-262, May 2001.

FINNERUP, N.B; OTTO, M; MCQUAY, H.J; JENSEN, T.S; SINDRUP, S.H. Algorithm for neuropathic pain treatment: An evidence based proposal. **Pain**, v. 118, p. 289-305, 2005.

FISCHER, Luana; TORRES-CHÁVEZ, Karla E.; CLEMENTE-NAPIMOGA, Juliana T.; JORGE, Dany; ARSATI, Franco; VEIGA, Maria Cecília F. de Arruda; TAMBELI, Claudia H. The influence of sex and ovarian hormones on temporomandibular joint nociception in rats. **The Journal Of Pain**, London, v.9, n.7, p.630-638, July 2008.

FORSSELL H, JÄÄSKELÄINEN, Satu; LIST, Thomas.; SVENSSON, Peter; BAAD-HANSEN, Lene. An update on pathophysiological mechanisms related to idiopathic oro- facial pain conditions with implications for management. **Journal of Oral Rehabilitation**, [s.l.], v.42, n.4, p.300-322, Dec. 2014.

FORTUNY, Esteban; GALLARDO, Pierinna; LIEBANO, Richard.
Fotobiomodulación: láser de baja potencia. Buenos Aires: Ril, 2018.

FRANCES, Richard J.; FRANKLIN, John E. Transtorno por uso de alcohol y otras sustancias psicoativas. In: HALES, Robert E; YUDOFKY, Stuart C; TALBOTT, John A. **Tratado de psiquiatria**. Barcelona: Ancora, 1995. p. 373-434.

GAGE, Gregory J.; KIPKE, Daryl R.; SHAIN, William. Whole animal perfusion fixation for rodents. **Journal of Visualized Experiments**, [s.l.], v.65, p.e3564, 2012.

GARCEZ, Aguinaldo Silva; RIBEIRO, Martha Simões; NÚÑEZ, Silvia Cristina.
Laser de baixa potência: princípios básicos e aplicações clínicas na odontologia. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

GAUMOND, Isabelle; ARSENAULT, Pierre; MARCHAND, Serge. Specificity of female and male sex hormones on excitatory and inhibitory phases of formalin-

induced nociceptive responses. **Brain Research**, Amsterdam, v.1052, n.1, p.105-111, 2005.

GERBI, Marleny E. Martinez; MARQUES, Aparecida M. C.; RAMALHO, Luciana M.P; PONZI, Elizabeth Arruda Carneiro; CARVALHO, Carolina Montagn; SANTOS, Rafael de Carneiro; OLIVEIRA, Priscila Chagas; NÓIA, Manuela; PINHEIRO, Antônio L.B. Infrared laser light further improves bone healing when associated with bone morphogenetic proteins: an in vivo study in a rodent model. **Photomedicine and Laser Surgery**, Larchmont, v. 26, n. 1, p. 55-60, Feb. 2008.

GLOBAL INDUSTRY ANALYSTS, Inc. **Global Pain Management Market to Reach US\$60 Billion by 2015, According to a New Report by Global Industry Analysts**. 2011. Disponível em:

<https://www.prweb.com/releases/2011/1/prweb8052240.htm>. Acesso em: 09 out. 2019.

GONÇALVES, Reggiani Vilela; NOVAES, Rômulo Dias; CUPERTINO, Marli do Carmo; MORAES, Bruna; LEITE, João Paulo Viana; PELUZIO, Maria do Carmo Gouveia; PINTO, Marcus Vinicius de Mello; MATTA, Sérgio Luis Pinto da. Time-dependent effects of low level laser therapy on the morphology and oxidative response of skin wound healing in rats. **Lasers in Medical Science**, [s.l.], v.28, n.2, p.383-390, 2013.

GONDIM, Delane Viana. Efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório da eletroacupuntura na artrite induzida por zymosan na articulação temporomandibular de ratos: participação do sistema endocanabinóide. 2012. 140f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, Antônio Javier; LORENTE-GUAL, Rafael. Indicaciones actuales y nuevas aplicaciones de los sistemas de luz pulsada intensa. **Actas Dermato-Sifiliográficas**, [s.l.], v.106, n.5, p.350-364, Jan. 2015.

GRANJA, D.V.A.; LIMA, A.P.; MACHADO, K. **Proposta de tratamento fisioterapêutico (protocolo glm) para portadores de disfunções temporomandibulares**. 2004. Disponível em: <http://www.portal.saudebrasil.com/artigospsb/odonto027.pdf>. Acesso em: 09 out. 2019.

GUR, Ali; CEVIK, Remzi; SARAC, Aysegul Jale; ALTIDAG, Oziem; SARAC, Serdar. Efficacy of 904 nm gallium arsenid low level laser therapy in the management of chronic myofascial in the neck: a double blind and randomised-controlled trial. **Lasers in Surgery and Medicine**, New York, v.35, n.3, p.229-235, 2004.

HAANPDD, Maija; ATTAL, Nadine; BACKONJA, Miroslav; BARON, Ralf; BENNETT, Michael; BOUHASSIRA, Didier; CRUCCU, Giorgio; HANSSON, Per; HAYTHORNTHWAITE, Jennifer A.; LANNETTI, Gian Domenico; JENSEN, Troels S.; KAUPPILA, Timo; NURMIKKO, Turo J.; RICE, Andrew S.; ROWBOTHAM, Michael; SERRA, Jordi; SOMMER, Claudia; SMITH, Blair H.; TREEDE, Rolf-Detlef. NeuPSIG guidelines on neuropathic pain assessment. **Pain**, Amsterdam, v.152, n.1, p.14-27, Jan. 2001.

HÄGGMAN-HENRIKSON, Brigitta; REZVANI, Maryam; LIST, Thomas. Prevalence of whiplash trauma in TMD patients: a systematic review. **Journal of Oral Rehabilitation**, Oxford, v.41, n.1, p.59-68, Jan. 2014.

HAGIWARA, Hiroko; KIMURA, Fukoko; MITSUSHIMA, Dai; FUNABASHI, Toshiya. Formalin-induced nociceptive behavior and c-Fos expression in middle-aged female rats. **Physiology & Behavior**, Elmsford, v.100, n.2, p.101-104, Feb. 2010.

HAI, Tsonwin; WOLFGANG, Curt D.; MARSEE, Derek K.; ALLEN, Amy E.; SIVAPRASAD, Umasundari. ATF3 and stress responses. **Gene Expression**, North Chicago, v.7, n.4-6, p.321-335, 1999.

HAKGÜDER, Aral; BIRTANE, Murat; GÜRCAN, Süleyman; KOKINO, Siranus; TURAN, Fatma Nesrin. Efficacy of low laser therapy in myofascial pain syndrome: an algometric and thermographic evaluation. **Lasers in Surgery and Medicine**, New York, v.33, p.339-343, 2003.

HAMBLIN, Michael R. Mechanisms and applications of the anti-inflammatory effects of photobiomodulation. **AIMS Biophys**, [s.l.], v. 4, n. 3, p. 337-361, 2017.

HARDIE, David Grahame. Minireview: the AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of energy status. **Endocrinology**, Baltimore, v.144, n.12, p.5179-5183, Dec. 2003.

HARGREAVES, Kenneth M. Congress Orofacial Pain. **Pain**, Philadelphia, v.152, n.3 Suppl, p.S25-S32, mar. 2011.

HASHMI, Javad T.; HUANG, Ying-Ying; SHARMA, Sulbha K.; KURUP, Divya Balachandran; DE TABOADA, Luis; CARROLL, James D.; HAMBLIN, Michael R. Effect of pulsing in low-level light therapy. **Lasers in Surgery and Medicine**, New York, v.42, n.6, p.450-466, Aug. 2010.

HATTORI, Yoshiyuki; SUZUKI, Kunihiro; HATTORI, Sachiko; KASAI, Kikuo. Metformin inhibits cytokine-induced nuclear factor B activation via AMP-activated protein kinase activation in vascular endothelial cells. **Hypertension**, Dallas, v.47, n.6, p.1183-1188, Jun. 2006.

HAVIV, Yaron; ZADIK, Yehuda; SHARAV, Yair; BENOLIEL, Rafael. Painful traumatic trigeminal neuropathy: An open study on the pharmacotherapeutic response to stepped treatment. **Journal of Oral & Facial Pain Headache**, [s.l.], v.28, n.1, p.52-60, Jan. 2014.

HOAR, William S.; HICKMAN, Cleveland P. Ovariectomy and the estrous cycle of the rat. In: William S.; HICKMAN, Cleveland P. (Eds.). **General and comparative physiology**. 2. ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1975. p. 260-265.

HO, Hao H.; ANTONIV, Taras T.; JI, Jong Dae; IVASHKIV, Lionel B. Lipopolysaccharide-induced expression of matrix metalloproteinases in human monocytes is suppressed by IFN-gamma via superinduction of ATF-3 and suppression of AP-1. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.18, n.7, p.5089-5097, Oct. 2008.

HOUCK, Jeff; KNEISS, Janet; BUKATA, Susan V.; PUZAS, J. Edward. Analysis of vertical ground reaction force variables during a Sit to Stand task in participants recovering from a hip fracture. **Clinical Biomechanics** (Bristol, Avon), Oxford, v.26, n.5, p.470-476, Jun. 2011.

HU, Wan-Ping; WANG, Jeh-Jeng; YU, Chia-Li; LAN, Cheng-Che; CHEN, Gow-Shing; YU, Hsin-Su. Helium-neon laser irradiation stimulates cell proliferation through photostimulatory effects in mitochondria. **Journal of Investigative Dermatology**, Baltimore, v.127, n.8, p.2048-2057, 2007.

HUANG, N. L.; CHIANG, S. H.; HSUEH, C. H.; LIANG, Y. J.; CHEN, Y. J.; LAI, L. P. Metformin inhibits TNF--induced IB kinase phosphorylation, IB- degradation and IL-6 production in endothelial cells through PI3K-dependent AMPK phosphorylation. **International Journal of Cardiology**, Amsterdam, v.134, n.2, p.169-175, May 2009.

HUANG, Ying-Ying; CHEN, Aaron C.H; CARROLL, James D; HAMBLIN, Michael R. Biphasic dose response in low level light therapy. **Dose Response**, Amherst, v.7, n.4, p.358–383, Sep. 2009.

HURLEY, Robert W.; ADAMS, Meredith C.B. Sex, gender and pain: an overview of a complex field. **Anesthesia & Analgesia**, Cleveland, v.107, n.1, p.309-317, Jul. 2008.

IMAMURA, Yoshiki; KAWAMOTO, Hiroya; NAKANISHI, Osamu. Characterization of heat-hyperalgesia in an experimental trigeminal neuropathy in rats. **Experimental Brain Research**, Berlin, v.116, n.1, p.97-103, Aug. 1997.

INYANG, Kufreobong E.; SZABO-PARDI, Thomas; WENTWORTH, Emma; MCDUGAL, Timothy A.; DUSSOR, Gregory; BURTON, Michael D.; PRICE, Theodore J. The antidiabetic drug metformin prevents and reverses neuropathic pain and spinal cord microglial activation in male but not female mice. **Pharmacological Research**, London, v.139, p.1-16, Jan. 2018.

ISODA, K.; YOUNG, J. L.; ZIRLIK, A.; MACFARLANE, L. A.; TSUBOI, N.; GERDES, N.; SCHÖNBECK, U.; LIBBY, P. Metformin inhibits proinflammatory responses and nuclear factor- κ B in human vascular wall cells. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, Dallas, v.26, n.3, p.611–617, Mar. 2006.

JÄÄSKELÄINEN, Satu K. Clinical neurophysiology and quantitative sensory testing in the investigation of orofacial pain and sensory function. **Journal of Orofacial Pain**, Carol Stream, v.18, n.2, p.85–107, Feb. 2004.

JENSEN, T.S; MADSEN, C.S; FINNERUP, N.B. Pharmacology and treatment of neuropathic pains. **Current Opinion in Neurology**, v. 22, p. 467- 474, 2009.

JENSEN, Troels S.; FINNERUP, Nanna B. Allodynia and hyperalgesia in neuropathic pain: clinical manifestations and mechanisms. **The Lancet Neurology**, [s.l.], v.13, n.9, p.924-935, Sep. 2014.

JONGEN, Joost L. M.; HANS, Guy; BENZON, Honorio T.; HUYGEN, Frank. Neuropathic pain and pharmacological treatment. **Pain Practice**, [s.l.], v.14, n.3, p.283-295, June 2014.

JULIUS, D; BASBAUM, A.I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, n. 6852, p. 203-10, 2001.

KARU, Tiina I. Photobiology of low-power laser effects. **Health Physics**, New York, v.56, n.5, p.691-704, 1989.

KARU, Tiina I.; KOLYAKOV, S. F. Exact Action Spectra for Cellular Responses Relevant to Phototherapy. **Photomedicine and Laser Surgery, Larchmont**, [s.l.], v. 23, n.1, p.355-361, 2005.

KATUSIC, Slavica; BEARD, Mary C.; BERGSTRALH, Erik; KURLAND, LeonardT. Incidence and clinical features of trigeminal neuralgia, Rochester, Minnesota, 1945-1984. **Annals of Neurology**, Boston, v.27, n.1, p.89-95, 1990.

KHAMSEH, Mohammad E.; KAZEMIKHO, N.; AGHILI, Rokhsareh; FOROUGH, Bijan; LAJEVARDI, Marjan; DABAGHIAN, Fataneh Hashem; GOUSHEGIR, A.; MALEK, Mojtaba. Diabetic distal symmetric polyneuropathy: effect of low- intensity laser therapy. **Lasers in Medical Science**, London, v.26, n.6, p.831–835, Aug. 2011.

KHAN, Junad; ZUSMAN, Tal; WANG, Qlan; ELIAV, Eli. Acute and chronic pain in orofacial trauma patients. **Journal of Endodontics**, Baltimore, v.45, n.12, p.S28-S38, Dec. 2019.

KIM, Juyoung; KWAK, Hyun Jeong; CHA, Ji-Yount; JEONG, Yun-Seunt; RHEE, Sang Dahl; KIM, Kwang Rok; CHEON, Hyaee Gyeong. Metformin Suppresses Lipopolysaccharide (LPS)-induced Inflammatory Response in Murine Macrophages via Activating Transcription Factor-3 (ATF-3) Induction. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.289, n.33, p.23246–23255, Aug. 2014.

KOHLMANN, Thomas. Epidemiology of orofacial pain. **Schmerz**, Berlin, v. 16, n. 5, p. 339-45, Sep. 2002.

KREISLER, Matthias; CHRISTOFFERS, Ann B; WILLERSHAUSEN, Brita; D'HOEDT, Bernd. Effect of low-level GaAlAs laser irradiation on the proliferation rate of human periodontal ligament fibroblasts: an in vitro study. **Journal of Clinical Periodontology**, Copenhagen, v.30, n.4, p.353-358, 2003.

KRELING, Maria Clara Giorio Dutra; CRUZ, Diná de Almeida Lopes Monteiro da; PIMENTA, Cibele Andrucioli de Mattos. Prevalência de dor crônica em adultos. **Revista Brasileira de Enfermagem**, Rio de Janeiro, v.59, n.4, p.509-513, 2006.

LACERDA, Josimari Telino de; RIBEIRO, Juliana Demétrio; RIBEIRO, Dayane Machado; TRAEBERT, Jefferson. Prevalência da dor orofacial e seu impacto no desempenho diário em trabalhadores das indústrias têxteis do município de Laguna, SC. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v.16, n.10, p.4275-4282, Out. 2011.

LACERDA, Josimari Telino de; TRAEBERT, Jefferson; ZAMBENEDETTI, Mari Lúcia. Dor orofacial e absenteísmo em trabalhadores da indústria metalúrgica mecânica. **Saúde e Sociedade**, São Paulo, v.17, n.4, p.182-191, 2008.

LAPCHAK, Paul A.; DE TABOADA, Luis. Transcranial near infrared laser treatment (NILT) increases cortical adenosine-5'-triphosphate (ATP) content following embolic strokes in rabbits. **Brain Research**, Amsterdam, v.1306, n.8, p.100-105, Jan. 2010.

LESSARD, Chantale; CONTANDRIOPOULOS, André-Pierre; BEAULIEU, Marie-Dominique. The role of economic evaluation in the decision-making process of family physicians: design and methods of a qualitative embedded multiple-case study. **BMC Family Practice**, [s.l.], v.10, p.15, Feb. 2009.

LEUNG, Wing S; McMILLAN, Anne S; WONG, May Chun Mei. Chronic orofacial pain in southern Chinese people: experience, associated disability, and help-seeking response. **Journal of Orofacial Pain**, Carol Stream/US, v. 22, n. 4, p. 323-30, 2008.

LI, Zoongyang; LIU, Yamin; WANG, Liwei; LIU, Xinmin; CHANG, Qi; GUO, Zhi; LIAO, Yonghong; PAN, Ruile; FAN, Tai-Ping. Memory-enhancing effects of the crude extract of polygala tenuifolia on aged mice. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. [s.l.], v.2014, [s.n.], p.1-10, 2014.

LIM, Chung Thong; KOLA, Blrtins; KORBONITS, Márta. AMPK as a mediator of hormonal signalling. **Journal of Molecular Endocrinology**, New York, v.44, n.2, p.87-97, Feb. 2010.

LIPTON, James A; SHIP, Jonathan A; LARACH-ROBINSON, Dina. Estimated prevalence and distribution of reported orofacial pain in the United States. **The Journal of the American Dental Association**, Chicago, v. 124, n. 10, p.115-121, Oct. 1993.

LIST, Thomas; LEIJON, Goran; SVENSSON, Peter. Somatosensory abnormalities in atypical odontalgia: a case-control study. **Pain**, Amsterdam, v.139, n.2, p.333-341, July 2008.

LOGAN, I. D. et al. Low intensity laser irradiation includes DNA repair in X-ray, damage friend erythroleukaemia and HL-60 cel. **Laser Therapy**, London, v.6, n.1, p.30-36, 1994.

LONG, J. A.; EVANS, Herbert M. **The estrous cycle in the rat and its associated phenomena**. Berkeley, Califórnia: University of California Press, 1922.

LOPES-MARTINS, Rodrigo Álvaro; MARCOS, Rodrigo Labat; LEONARDO, Patrícia Sardinha; PRIANTI JR., Antônio Carlos; MUSCARÁ, Marcelo Nicolás; AIMBIRE, Flávio; FRIGO, Lúcio; IVERSEN, Vegard V.; BJARDAL, Jan Magnus. Effect of low-level laser (Ga-Al-As 655 nm) on skeletal muscle fatigue induced by electrical stimulation in rats. **Journal of Applied Physiology**, Washington, v.101, n.1, p.283-288, 2006.

LUBART, Rachel; EICHLER, Maor; LAVI, Ronit; FRIEDMAN, Harry; SHAINBERG, Asher. Low-energy laser irradiation promotes cellular redox activity. **Photomedicine and Laser Surgery**, Larchmont, v.23, n.1, p.3-9, Feb. 2005.

MACÊDO, D. D. P. Capacitação em dor. In: **Módulo 1 - Fundamentos da dor**. Programa de Educação Médica Continuada Oficial da Sociedade Brasileira para o estudo da Dor. São Paulo; 2004. [CD ROM].

MACFARLANE, Tatiana V; BLINKHORN, Anthony S.; DAVIES, Robin M.; KINCEY, John; WORTHINGTON, Helen V. Oro-facial pain in the community: prevalence and associated impact. **Community Dentistry and Oral Epidemiology**, Copenhagen, v. 30, n. 1, p.56-60, Mar. 2002.

MACFARLANE, Tatiana V; GLENNY, Anne Marie; WORTHINGTON, Helen V. Systematic review of population- based epidemiological studies of orofacial pain. **Journal of Dentistry**, Ottawa, v.29, n.7, p.451- 467, Sep. 2001.

MAGALHAES, Francisco Ernani Alves; SANTOS, Sacha Aubrey Alves Rodrigues; OLIVEIRA, B; DE MELO JÚNIOR, J; VIEIRA-NETO, A; BARROS, Adriana Rolim Campos. New trick for an old drug: preclinical evidence for the use of metformin to treat acute and neuropathic orofacial pain. In: **17th World Congresso on Pain**, 2018.

MALYSHKIN, Andrey; SHEKUNOVA, E.; KASHKIN, Vladimir. 221 Effect of sex hormones on mechanical and cold allodynia following sciatic nerve ligation in rats. **European Journal of Pain**, London, v.13, p.S71–S72, Sep. 2009.

MAO-YING, Qi-Liang; KAVELAARS, Annemieke; KRUKOWSKI, Karen; HUO, Xião-Jiào; ZHOU, Wenjun; PRICE, Theodore J.; CLEELAND, Charles; HEIJNEN, Cobi J. The anti-diabetic drug metformin protects against chemotherapy-induced peripheral neuropathy in a mouse model. **PLoS One**, San Francisco, v.9, n.6, p.e100701, June 2014.

MARCONDES, Fernanda Klein; BIANCHI, Fábio José; TANNO, Ana Paula. Determinação das fases do ciclo estral em ratas: considerações úteis. **Brazilian Journal of Biology**, São Paulo, v.62, n.4a, p.609-614, 2002.

MAROVINO, Tiziano. Cold lasers in pain management. **Practical Pain Management**, [s.l.], v.4, n.6, p.37-42, Sep./Oct. 2004.

MARTINS, M.M.M. Laser e LED na terapia capilar. In: DAMAZIO, Marlene Gabriel; MAKINO, Rosa de Fátima Lago. **Terapia capilar: uma abordagem interdisciplinar**. São Paulo: Red Publicações, 2017.

MATERA, Julia Maria; TATARUNAS, Angelica Cecília; OLIVEIRA, Sandra Maria. Uso do laser arseneto de gálio (904nm) após excisão artroplástica da cabeça do fêmur em cães. **Acta Cirúrgica Brasileira**, [s.l.], v.18, n.2, p.102-106, 2003.

McMILLAN, Anne S.; WONG, May Chun Mei; ZHENG, Jun; LAM, Cindy Lo-Kuen. Prevalence of orofacial pain and treatment seeking in Honf Kong Chinese. **Journal of Orofacial Pain**, Carol Stream/US, v.20, n.3, p.218-225, June 2006.

MEDEIROS, Suéllen Peixoto de; BATISTA, André Ulisses; FORTE, Franklin Delano Soares. Prevalência de sintomas de disfunção temporomandibular e hábitos parafuncionais em estudantes universitários. **Revista Gaúcha de Odontologia**, Porto Alegre, v.59, n.2, p.201-208, abr./jun. 2011.

MELEMEDJIAN, Ohannes K.; ASIEDU, Marina N.; TILLU, Dipti V.; PEEBLES, Katherine A.; YAN, Jin; ERTZ, Natalie; DUSSOR, Gregory O.; PRICE, Theodore J. Il-6- and ngf-induced rapid control of protein synthesis and nociceptive plasticity via convergent signaling to the eif4f complex. **Journal of Neuroscience**, Baltimore, v.30, n.45, p.15113-15123, Nov. 2010.

MELEMEDJIAN, Ohannes K.; ASIEUDU, Marina N. TILLU, Dipti V.; SANOJA, Raul; YAN, Jin; LARK, Arianna; KHOUTORSKY, Arkady; JOHNSON, Jessica; PEEBLES, Katherine A.; LEPOW, Talva; SONENBERG, Nahum; DUSSOR, Gregory O.; PRICE, Theodore J. Targeting adenosine monophosphate-activated protein kinase (ampk) in preclinical models reveals a potential mechanism for the treatment of neuropathic pain. **Molecular Pain**, [s.l.], v.7, n.1, p.70, Sep. 2011.

MELEMEDJIAN, Ohannes K.; KHOUTORSKY, Arkady; SORGE, Robert E.; YAN, Jin; ASIEDU, Marina N.; VALDEZ, Arely; GHOSH, Souray; DUSSOR, Gregory O.; MOGIL, Jeffrey S.; SONENBERG, Nahum; PRICE, Theodore J. mTORC1 inhibition induces pain via IRS-1-dependent feedback activation of ERK. **Pain**, Amsterdam, v.154, n.7, p.1080-1091, Jul. 2013.

MELIS, Marcello; SECCI, Simona. Diagnosis and treatment of atypical odontalgia: A review of the literature and two case reports. **The Journal of Contemporary Dental Practice**, [s.l.], v.8, n.3, p.81-89, Mar. 2007.

MELO, Daniela Oliveira de; RIBEIRO, Eliane; STORPIRTIS, Sílvia. A importância e a história dos estudos de utilização de medicamentos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v.42, n.4, p.475-485, out./dez. 2006.

MICHEL-CROSATO, Edgard; BIAVENIC, Maria Gabriela Haye; NARDI, Anderson; CROSATO, Edgard. Relação entre dor orofacial e qualidade de vida: um estudo em trabalhadores. **UFES Revista de Odontologia**, Vitória, v.8, n.2, p.45-52, maio/ago. 2006.

MICÓ, J.A; ARDID, D; BERROCOSO, E; ESCHALIER, A. Antidepressants and pain. **TRENDS in Pharmacological Sciences**, v. 27, n. 7, p. 348-354, 2006.

MOGIL, Jeffrey S. Sex differences in pain and pain inhibition: multiple explanations of a controversial phenomenon. **Nature Reviews Neuroscience**, London, v.13, n.12, p.859-866, Dec. 2012.

MOLINARO, Etelcia Moraes; CAPUTO, Luzia Fátima Gonçalves; AMENDOEIRA, Maria Regina Reis (Orgs.). **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde**: volume 2. Rio de Janeiro: EPSJV; IOC, 2010.

MOREIRA, Sônia Fátima da Silva. **Avaliação de modelo de menopausa em ratas**: parâmetros fisiológicos, comportamentais, bioquímicos e novas estratégias terapêuticas. 2014. 151 f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) -- Universidade

Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, 2014.

MOSS, Andrew; INGRAM, Rachel; KOCH, Stephanie; THEODOROU, Andria; LOW, Lucie; BACCEL, Mark; HATHWAY, Gareth J.; COSTIGAN, Michael; SALTON, Stephen R.; FITZGERALD, Maria. Origins, actions and dynamic expression patterns of the neuropeptide VGF in rat peripheral and central sensory neurones following peripheral nerve injury. **Molecular Pain**, [s.l.], v.4, n.1, p.62. Dec. 2008.

MOY, Jamie K.; KHOUTORSKY, Arkady; ASIEDU, Marina N.; BLACK, Bryan J.; KUHN, Jasper L.; BARRAGAN-IGLESIAS, Paulino; MEGAT, Salim; BURTON, Michael D.; BURGOS-VEJA, Carolina C.; MELEMEDJIAN, Ohannes K.; BOITANO, Scott; VAGNER, Josef; GKOGKAS, Christos G.; PANCRAZIO, Joseph J.; MOGIL, Jeffrey S.; DUSSOR, Gregory; SONENBERG, Nahum; PRICE, Theodore J. The mnk-eif4e signaling axis contributes to injury-induced nociceptive plasticity and the development of chronic pain. **The Journal of Neuroscience**, Baltimore, v.37, n.31, p.7481-7499, Aug. 2017.

MÜLLER, Daniel; OBERMANN, Mark; YOON, Min-Suk; POITZ, Franziska; HANSEN, Neils Jorgen; SLOMKE, M.A.; DOMMES, Peter L; GIZEWSKI, Elke; DIENER, Hans-Christoph; KALSARAVA, Zaza. Prevalence of trigeminal neuralgia and persistente idiopathic facial pain: a population-based study. **Cephalalgia**, Oslo, v.31, n.15, p.1542-1548, Nov. 2011.

NAVRATIL, L.; KYMPLOVA, J. Contra Indications of therapeutic laser. In: KITCHEN, Sheila. **Eletroterapia: prática baseada em evidência**. São Paulo (SP): Manole, 2000. p. 171-189.

NES, Andrea G.; POSSO, Maria Belén Salazar. Patients with moderate chemotherapy-induced mucositis: pain therapy using low intensity lasers. **International Nursing Review**, Geneve, v.52, n.1, p.68-72, Mar. 2005.

OLIVEIRA, Andrea Lourenço de; PEREZ, Erika; SOUZA, Janaína Binhame de; VASCONCELOS, Maria Goreti de. **Curso didático de estética**. 2. ed. São Caetano do Sul, SP: Yendis, 2014.

ÖZDEMİR, Ferda; BIRTANE, Murat; KOKINO, S. The Clinical Efficacy of Low Power Laser Therapy on Pain and Function in Cervical Osteoarthritis. **Clinical Rheumatology**, [s.l.], v.20, n.3, p.181-184, Feb. 2001.

PAXINOS, George; WATSON, Charles. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. 2nd ed. Sydney: Academic Press, 1986.

PARK, H.J; MOON, D.E. Pharmacologic Management of Chronic Pain. **The Korean Journal of Pain**, v. 23, n. 2), p. 99- 108, 2010.

PEDRO, Miguel de; LÓPEZ-PINTOR, Rosa María; HOZ=AIZPURUA, José Luis de la; CASAÑAS, Elisabeth; HERNÁNDEZ, Gonzalo. Efficacy of Low-Level Laser Therapy for the Therapeutic Management of Neuropathic Orofacial Pain: A Systematic Review. **Journal of Oral & Facial Pain and Headache**, [s.l.], Jul. 2019.

PENARROCHA, María A.; PENARROCHA, David; BAGAN, José V.; PEÑARROCHA, Miguel. Post-traumatic trigeminal neuropathy: a study of 63 cases. **Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal**, [s.l.], v.17, n.2, p.e297–e300, Mar. 2012.

PENG, Jiyun; GU, N.; ZHOU, L.; B-EYO, U.; MURUGAN, M.; GAN, W.B.; WU, L.J. Microglia and monocytes synergistically promote the transition from acute to chronic pain after nerve injury. **Nature Communications**, London, v.7, p.12029, Jun. 2016.

PERCEGONI, N.; FERREIRA, Andrea Claudia Freitas; RODRIGUES, C.F.; ROSENTHAL, Doris; CASTELO BRANCO, Morgana T.L.; RUMJANEK, Vivian Mary; CARVALHO, Denise Pires de. Profile of serum IL-1beta and IL-10 shortly after ovariectomy and estradiol replacement in rats. **Hormone and Metabolic Research**, Stuttgart, v.41, n.1, p.50-54, Nov. 2009.

PEREIRA, Anamaria Falcão; PEREIRA, Lus Mário Silva; SILVA, Cristiane Maria Pereiura; ALVES, Bruno Wesley Freitas; BARBOSA, Jéssica Sales; PINTO, Francisco Maxwell; PEREIRA, Ana Carolina; SILVA, Karla Oliveira; PONTES, Renata Bessa; ALENCAR, Nylane Maria Nunes; LIMA JÚNIOR, Roberto César Pereira; VALE, Mariana Lima. Metformin reduces c-Fos and ATF3 expression in the dorsal root ganglia and protects against oxaliplatin-induced peripheral sensory neuropathy in mice. **Neuroscience Letters**, Amsterdam, v.704, p.134378, Sep. 2019.

PEREIRA, Lus Mário da Silva. **Neuropatia sensitiva periférica induzida por oxaliplatina em camundongos: influência do Diabetes Mellitus e o efeito protetor da metformina**. 2017. 141f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

PESCHILLO, Simone; DELFINI, R. Trigeminal neuralgia: a new neuroimaging perspective. **World Neurosurgery**, [s.l.], v.80, n.1-3, p.293-295, Sep./Out. 2012.

PIGG, Maria; SVENSSON, Peter; DRANGSHOLT, Mark T.; LIST, Thomas. Seven-year follow-up of patients diagnosed with atypical odontalgia: A prospective study. **Journal of Orofacial Pain**, Carol Stream, v.27, n.2, p.151–164, Mar. 2013.

PINHEIRO, Antônio Luiz Barbosa; NASCIMENTO, Silene Carneiro do; ALESSANDRO, Leonardo de Barros Vieira; ROLIM, Aluizio Barros; SILVA, Pedro Soriano da; BRUGNERA JR., Aldo. Does LLLT stimulate laryngeal carcinoma in vitro study. **Brazilian Dental Journal**, Ribeirão Preto, v.13, n.2, p.109-112, 2002.

PRICE, Theodore J.; DAS, Vaskar; DUSSOR, Gregory. Adenosine monophosphate-activated protein kinase (ampk) activators for the prevention, treatment and potential reversal of pathological pain. **Current Drug Targets**, Hilversum, v.17, n.8, p.908-920, 2016.

PROCKT, Anderson Pedroso; TAKAHASHI André; PAGNONCELLI, Rogério Miranda. Uso de terapia com laser de baixa intensidade na cirurgia bucomaxilofacial. **Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial**, [s.l.], n.49, n.4, p.247- 255, Dec. 2008.

PubCHEM. **Metformin**. Disponível em:

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/metformin>. Acesso em: 12 nov. 2019.

PUGLIESE, Livia Souza; MEDRADO, Alena Peixoto; REIS, Silvia Regina de; ANDRADE, Zilton de Araújo. The influence of low-level laser therapy on biomodulation of collagen and elastic fibers. *Pesquisa Odontológica Brasileira*, São Paulo, v.17, n.4, p.307-313, 2003.

RENTON, Tara; YILMAZ, Zehra. Profiling of patients presenting with posttraumatic neuropathy of the trigeminal nerve. *Journal of Orofacial Pain*, Carol Stream, v.25, n.4, p.333–344, Sep. 2011.

RIBEIRO, Martha Simões; ZEZELL, Denise Maria. **Laser de baixa intensidade: a Odontologia e o laser**. São Paulo: Quintessense, 2004.

RICHEIMER, Steven; BAJWA, Z.H.; KAHRAMAN, S.S.; RANSIL, B.J.; WARFIELD, Carol A. Utilization patterns of tricyclic antidepressants in a multidisciplinary pain clinic: a survey. *The Clinical Journal of Pain*, [s.l.], v.13, n.4, p.324-329, Dec 1997.

RICO, Maria Antonieta; KRAYCHETE, Durval Campos; ISKANDAR, Aziza Jreige; COLIMON, Frantz; LARA-SOLARES, Argelia; CANTISANI, José Alberto Flores; AMESCUA—ARCÍA, César; NUÑEZ, Maria Del Rocio Guillén; BONILLA, Patrícia; et al. Use of opioids in Latin American: The need of an Evidence-based change. *Pain Medicine*, Malden, v.17, n.4, p.704-716, Apr. 2016.

ROBERTSON, J; LANG, D; HILL, S. Use of pharmacoeconomics in prescribing research. Part 1: costs-moving beyond the acquisition price for drugs. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, Oxford, v.28, n.1, p.73-79, Feb. 2003.

ROMERO-REYES, Marcela; AKERMAN, Simon; NGUYEN, Elaine; VIJESWARAPU, Alice; HOM, Betty; DONG, Hong-Wei; CHARLES, Andrew C. Spontaneous behavioral responses in the orofacial region: a model of trigeminal pain in mouse. *Headache*, St. Louis, v.53, n.1, p.137-151, Jul. 2013.

ROMERO-REYS, Marcela; AKERMAN, Simon; NGUYEN, Elaine; VIJESWARAPU, Alice; HOM, Betty; DONG, Hong-Wei; CHARLES, Andrew C. Spontaneous behavioral responses in the orofacial region: A model of trigeminal pain in mouse. *Headache*, St. Louis, v.53, n.1, p.137-151, Jan. 2013.

ROSSETTO, Edilaine Giovanini; DELLAROZA, M.S.G.; KRELING, Maria Clara Giorio Dutra; CRUZ, D.A.L.; PIMENTA, Cibele Andrucio de Mattos. Epidemiologia da dor em crianças, adultos e idosos: análise e crítica. *Arquivo Brasileiro de Neurocirurgia*, São Paulo, v.18, n.4, p.213-224, 1999.

ROTTA, Newra Tellechea; LAGO, I.S.; OHLWEILER, Lygia; DRACHLER, M.L.; SOUTO, L.D.; LYRA, A.B.; LEITE, N.P.; FREIRE, MEN. Cefaléia como queixa ambulatorial em pediatria. *Revista do Hospital de Clinicas de Porto Alegre*, Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, v.5, p.25-27, 1985.

- RUDDY, Rebecca M.; ADAMS, Kelsey V.; MORSHEAD, Cindi M. Age-and sex-dependent effects of metformin on neural precursor cells and cognitive recovery in a modelo f neonatal stroke. **Science Advances**, [s.l.], v.5, n.9, p.eaax1911, Sep. 2019.
- RUDOLPH, M,K. Trigeminal neuralgia. **American Family Physician**, Kansas City, v.77, n.9, p.1291- 1296, May 2008.
- RUVIARO, Luiz Fernando; FILIPPIN, Lidiane Isabel. Prevalência de dor crônica em uma Unidade Básica de Saúde de cidade de médio porte. **Revista Dor**, São Paulo, v.13, n.2, p.128-131, 2012.
- RYBACZYK, Leszek A.; BASHAW, Meredith J.; PATHAK, Dorothy R.; MOODY, Scott M.; GILDERS, Roger M.; HOLZSCHU, Donald L. An overlooked connection: Serotonergic mediation of estrogen-related physiology and pathology. **BMC Women's Health**, London, v.20, p.5-12, Dec. 2005.
- SACCO, Isabel de Camargo; TANAKA, Clarice. **Cinesiologia e biomecânica dos complexos articulares**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- SALTER, M.W.; BEGGS, S. Sublime micróglia: expanding roles for the guardians of the CNS. **Cell**, [s.l.], v.158, n.1, p.15-24, Jul. 2014.
- SANOJA, Raul; CERVERO, Fernando. Estrogen-dependent changes in visceral afferent sensitivity. **Autonomic Neuroscience**, New York, v.153, n.1-2, p.84–89, 2010.
- SANTOS, C.F; SOUZA, P.M.R. **Força-Tarefa na Dor em Idosos**. Grupo Editorial Moreia Jr, 45-56p, 2011.
- SCHAPPERT, Susan M.; BURT, Catharine W. Ambulatory care visits to physician offices, hospital outpatient departments, and emergency departments: United States, 2001-02. National Center for Health Statistics. **Vital Health Statistics**, Washington, v.13, n.159, p.1-66, 2006.
- SCHESTATSKY, Pedro; LLADÓ-CARBÓ, Estela; CASANOVA-MOLLA, Jordi; ÁLVAREZ-BLANCO, Silvio; VALLS-SOLÉ, Jospe. Small fibre function in patients with meralgia paresthetica. **Pain**, Amsterdam, v.139, n.2, p.342-348, Oct. 2008.
- SEERS, Kate. Chronic non-malignant pain. **British Journal of General Practice**, London, v.42, p.452-453, 1992.
- SESSLE, B.J. Acute and chronic cranifacial pain: brainstem mechanisms of nociceptive transission and neuroplasticity, and their clinical correlates. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, Boca Raton, v.11, n.1, p.57-91, Jan. 2000.
- SHANSKY, Rebecca M. Are hormones a “female problem” for animal research? **Science**, Washington, v.364, n.6443, p.825–826, Mar. 2019.
- SILVA, Joaquim José de Lima; LIMA, Antônia Artemisa Aurélio Soares; TORRES, Silvio Melo. Fratura de face: análise de 105 casos. **Revista da Sociedade Brasileira de Cirurgia Craniomaxilofacial**, São Paulo, v.10, n.2, p.41-50, 2009.

SILVA, Silvio R.C.; LEITE, Carla M.C.; FERRAZ, Maria A.A.L.; SILVA, Moisés F.B.; SOUSA, Yara T.C.S. Dor orofacial e qualidade de vida de adultos. **Revista Odontológica do Brasil Central**, Goiânia, v.21, n.56, p.421-425,2012.

SILVEIRA, Paulo C.L.; STRECK, Emilio L.; PINHO, Ricardo A. Evaluation of mitochondrial respiratory chain activity in wound healing by low-level laser therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Lausanne, v.86, n.3, p.279-282, Mar. 2007.

SINDRUP, S.H; OTTO, M; FINNERUP, N.B; JENSEN, T.S. Antidepressants in the Treatment of Neuropathic Pain. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 96, p. 399-409, 2005.

SIQUEIRA, Silvia R.D.T.; NÓBREGA, J.C.M.; SIQUEIRA, José Tadeu Tesseroli de; TEIXEIRA, Manoel J. Sensitive evaluation of patients with idiopathic trigeminal neuralgia treated with functional neurosurgery. **Journal The Pain Clinic**, [s.l.], v.18, n.1, p.87-92, Jan. 2006.

SIQUEIRA, Sílvia R.D.T.; SIVIERO, Mariana; ALVAREZ, Fábio K.; TEIXEIRA, Manoel J.; SIQUEIRA, José T.T.de. Quantitative sensory testing in trigeminal traumatic neuropathic pain and persistent idiopathic facial pain. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, São Paulo, v.71, n.3, p.174–179, Mar. 2013.

SMITH, Jared G.; ELIAS, Leigh-Ann; YILMAZ, Zehra; BARKER, Sarah; SHAH, Kunai; SHAH, Sajni; RENTON, Tara. The psychosocial and affective burden of posttraumatic neuropathy following injuries to the trigeminal nerve. **Journal of Orofacial Pain**, [s.l.], v.27, n.4, p.293–303, 2013.

SMITH, Kendric C. The photobiological basis of low level laser radiation therapy. **Laser Therapy**, London, v.3, p.19-24, 1991.

SOUSA, Marcelo Victor Pires de; PRATES, Renato; KATO, IlkaT; SABINO, Caetano Padial; SUZUKI, Luis Cláudio; RIBEIRO, Martha S; YOSHIMURA, Elisabeth M. Laser scattering by transcranial rat brain illumination. **Proceedings of SPIE**, [s.l.], v.8427, Jun. 2012.

STERNBACH, Richard A. Survey of pain in the United States: the nuprin pain report. **The Clinical Journal of Pain**, Philadelphia, v.2, n.1, p.49-53, 1986.

SUTHERLAND, John C. Biological effects of polychromatic light. **Photochemistry and Photobiology**, Oxford, v.76, n.2, p.166-170, 2002.

TAL, Michael; ELIAV, Eli. Abnormal discharge originates at the site of nerve injury in experimental constriction neuropathy (CCI) in the rat. **Pain**, Amsterdam, v.64, n.3, p.511-518, Mar. 1996.

TAVARES, Marcelo Rodrigo; MAZZER, Nilton; PASTORELLO, Mônica. Efeito terapêutico na cicatrização tendinosa: estudo experimental em ratos. **Fisioterapia Brasil**, Rio de Janeiro, v.6, n.2, p.96-100, mar./abr. 2005.

TAYLOR, Amber; WESTVELD, Anton H.; SZKUDLINSKA, M.; GURUGURI, P.; ANNABI, Emil; PATWARDHAN, Amol; PRICE, T.J.; YASSINE, Hussein N. The

use of metformin is associated with decreased lumbar radiculopathy pain. **Journal of Pain Research**, London, v.6, p.755–763, Dec. 2013.

TAYLOR, Cormac T.; MONCADA, Salvador. Nitric oxide, cytochrome C oxidase, and the cellular response to hypoxia. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, Dallas, v.30, p.643-647, 2010.

TEIXEIRA, Manoel Jacobsen; SHIBATA, M.K.; PIMENTA, Cibele Andrucioli de Mattos; CORRÊA, C.F. Dor no Brasil: estado atual e perspectivas. In: TEIXEIRA, Manoel Jacobsen; CORRÊA, C.F.; PIMENTA, Cibele Andrucioli de Mattos. (Orgs.). **Dor: conceitos gerais**. São Paulo: Limay, 1995.

TEIXEIRA, Manoel Jacobsen; SIQUEIRA, José Tadeu Tesseroli de; ALVAREZ, Fábio Kurogi. Fisiopatologia da dor/glossário de termos para a semiologia da dor. In: TEIXEIRA, Manoel Jacobsen; SIQUEIRA, José Tadeu Tesseroli de (Eds.). **Dores orofaciais: diagnóstico e tratamento**. São Paulo: Artes Médicas, 2012. p.63-81.

TERENZIO, Marco; KOLEY, Sandip; SAMRA, Nitzan; RISHAL, Ida; ZHAO, Qian; SAHOO, Pabitra K.; URISMAN, Anatoly; MARVALDI, Letizia; OSES-PRieto, Juan A.; FORESTER, Craig; GOMES, Cynthia; KALINSKI, Ashley L.; DI PIZIO, Agostina; DORON-MANDEL, Ella; PERRY, Rotem Ben-Tov; KOPPEL, Indrek; TWISS, Jeffery L.; BURLINGAME, Alma L.; FAINZILBER, Mike. Locally translated mtor controls axonal local translation in nerve injury. **Science**, Washington, v.359, n.6382, p.1416-1421, 2018.

THOMPSON, Analisa D, ANGELOTTI, Timothy; NAG, Subodh; MOKHA, Sukhbir S. Sex-specific modulation of spinal nociception by alpha-adrenoceptors: differential regulation by estrogen and testosterone. **Neuroscience**, Beijing, v.153, n.4, p.1268-1277, Jun. 2008.

TILLU, Dipti V.; MELEMEDJIAN, Ohannes K.; ASIEDU, Marina N.; QU, Ning; DE FELICE, Milene; DUSSOR, Gregory; PRICE, Theodore J. Resveratrol engages AMPK to attenuate ERK and Mtor signaling in sensory neurons and inhibits incision induced acute and chronic pain. **Molecular Pain**, [s.l.], v.9, p.5, Jan. 2012.

TORGRIMSON, Britta N.; MINSON, Christopher T. Sex and gender: what is the difference? **Journal of Applied Physiology**, Washington, v.99, n.3, p.785-787, 2005.

TSUJINO, Hiroaki; KONDO, Eiji; FUKUOKA, Tetsuo; DAI, Yi; NOGUCHI, Koichi. Activating transcription factor 3 (ATF3) induction by axotomy in sensory and motoneurons: A novel neuronal marker of nerve injury. **Molecular and Cellular Neurosciences**, San Diego, v.15, n.2, p.170-182, 2000.

VILELA, Márcio Gomes; SANTOS JÚNIOR, João Lúcio dos; SILVA, João Gilberto de Castro e. Determinação do ciclo estral em ratas por lavado vaginal. **Femina**, Rio de Janeiro v.35, n.10, p.667-670, out. 2007.

VISSERS, Kris; MEERT, Theo. A behavioral and pharmacological validation of the acetone spray test in gerbils with a chronic constriction injury. **Anesthesia & Analgesia**, Cleveland, v.101, n.2, p.457–464, 2005.

VLADIMIROV, Yury Andreevich; OSIPOV, Anatoly N.; KLEBANOV, G.I. Photobiological principles of therapeutic applications of laser radiation. **Biochemistry**, Moscou, v.69, n.1, p.81-90, 2004.

VLAINICH, Roberto; ZUCCHI, Paola; ISSY, Adriana Machado; SAKATA, Rioko Kimiko. Avaliação do custo do medicamento para tratamento ambulatorial de pacientes com dor crônica. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, Campinas, v.60, n.4, p.402-405, jul./ago. 2010.

VON KORFF, Michael; DWORKIN, Samuel; LE RESCHE, Linda. Graded chronic pain status: an epidemiologic evaluation. **Pain**, Amsterdam, v.40, n.3, p.279-291, Mar. 1990.

VERDU, B; DECOSTERD, I; BUCLIN, T; STIEFEL, F; BERNEY, A. Antidepressants for the Treatment of Chronic Pain. **Drugs**, v. 68, n. 18, p. 2611-2632, 2008.

WATSON, Charles; PAXINOS, George. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. 7th ed. San Diego: Academic Press, 1996.

WENG, Weidong; YAO, Chenglun; POONIT, Keshav; ZHOU, Xijie; SUN, Chao; ZHANG, Feng; YAN, Hede. Metformin relieves neuropathic pain after spinal nerve ligation via autophagy flux stimulation. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, Bucharest, v.23, n.2, p.1313-1324, Feb. 2019.

WITTERS, Lee A. The blooming of the French lilac. **The Journal of Clinical Investigation**, New York, v.108, n.8, p.1105-1107, 2001.

WODA, Alain; TUBERT-JEANNIN, Stéphanie; BOUHASSIRA Didier; ATTAL, Nadine; FLEITER, Bernard; GOULET, Jean-Paul; GREMEAU-RICHARD, Christelle; NAVEZ, Maria Louise; PICARD, Pascale; PIONCHON, Paul; ALBUISSON, Eliane. Towards a new taxonomy of idiopathic orofacial pain. **Pain**, Amsterdam, v.116, n.3, p.396–406, Aug. 2005.

WONG-RILEY, Margaret T.; LIANG, Huan L.; EELLS, Janis T.; CHANCE, Britton; HENRY, Michele M.; BUCHMANN, Ellen; KANE, Mary Angela; WHELAN, Harry T. Photobiomodulation directly benefits primary neurons functionally inactivated by toxins: role of cytochrome c oxidase. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.280, n.6, p.4761-4771, 2005.

YAN, Weixing; CHOW, Roberta; ARMATI, Patrícia J. Inhibitory effects of visible 650- nm and infrared 808-nm laser irradiation on somatosensory and compound muscle action potentials in rat sciatic nerve: implications for laser-induced analgesia. **Journal of the Peripheral Nervous System**, New York, v.16, n.2, p.130-135, June 2011.

ZAGURY, Julyana G.; ELIAV, Eli; HEIR, Gary M.; NASRI-HEIR, Cybele; ANANTHAN, Sownya; PERTES, Richard; SHARAV, Yair; BENOLIEL, Rafael. Prolonged gingival cold allodynia: A novel finding in patients with atypical odontalgia. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics**, St. Louis, v.111, p.312–319, 2011.

ZANG M.; ZUCCOLLO, A.; HOU, X.; NAGATA, D.; WALSH, K.; HERSCOVITZ, H.; BRECHER, P.; RUDEMAN, N.B.; RUDERMAN, N.B.; COHEN, R.A. AMP-activated protein kinase is required for the lipid-lowering effect of metformin in insulin-resistant human HepG2 cells. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.279, n.47, p.898-905, Nov. 2004.

ZECHA, Judith A.; RABER-DURLACHER, Judith E.; NAIR, Raj G.; EPSTEIN, Joel B.; ELAD, Sharon; HAMBLIN, Michael R.; BARASCH, Andrei; MIGLIORATI, Cesar A.; MILSTEIN, Dan M.; GENOT, Marie-Thérèse; LANSAT, Liset; VAN DER BRINK, Ron; ARNABAT-DOMINGUEZ, Josep; VAN DER MOLEN, Lisette; JACOBI, Irene; VAN DIESEN, Judi; DE LANGE, Jan; SMEELE, Ludi E.; SCHUBERT, Mark M.; BENSADOUN, Rene-Jean. Low-level laser therapy / photobiomodulation in the anagement of side effects of cheoradiation therapy in head and neck câncer: part 2: proposed applications and treatment protocols. **Support Care Cancer**, Berlin, v.24, n.6, p.2793-2805, Jun. 2016.

ZENG, Yen Jing; LIN, Hsiang; WANG, You Cheng; CHANG, Ju Hsin; WU, Jih Huaj; HSU, Sheng Feng; TSAI, Shih Ying; LIN, Ching Huang; WEN, Yeong Ray. Laser acupuncture induced analgesic effect and molecular alterations in an incision pain model: a comparison with eletroacupuncture – induced effects. **Laser in Medical Science**, London, v.33, n.2, p.295-304, 2018.

ZHOU, Gaochao; MEYERS, Robert; LI, Ying; CHEN, Yuli; SHEN, Xiaolan; FENYK-MELODY, Judy; WU, Margaret; VENTRE, John; DOEBBER, Thomas; FUJII, Nobuharu; MUSI, Nicolas; HIRSHMAN, Michael; GOODYEAR, Laurie J.; MOLLER, David E. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. **Journal of Clinical Investigation**, New York, v.108, n.8, p.1167-1174, Oct. 2001.



**COMISSÃO DE ÉTICA
NO USO DE ANIMAIS**

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "EFEITO DO LASER E DO (-)-?-BISABOLOL NA INFLAMAÇÃO EXPERIMENTAL DA ARTICULAÇÃO TEMPOROMANDIBULAR DE RATOS", protocolada sob o CEUA nº 9601181117, sob a responsabilidade de **Aline Barbosa Teixeira Martins** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade de Fortaleza (CEUA/UNIFOR) na reunião de 11/04/2018.

We certify that the proposal "EFFECT OF LASER AND (-) - ?-BISABOLOL IN THE EXPERIMENTAL INFLAMMATION OF TEMPOROMANDIBULAR ARTICULATION OF RATS", utilizing 48 Heterogenics rats (males and females), protocol number CEUA 9601181117, under the responsibility of **Aline Barbosa Teixeira Martins** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Fortaleza's University (CEUA/UNIFOR) in the meeting of 04/11/2018.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [01/2018](#) a [06/2018](#) Área: [Medicina Veterinária](#)

Origem: [Não aplicável biotério](#)

Espécie: [Ratos heterogênicos](#)

sexo: [Machos e Fêmeas](#)

idade: [0 a 3 anos](#)

N: [48](#)

Linhagem: [wistar](#)

Peso: [250 a 300 g](#)

Local do experimento: Será realizado no Núcleo de Biologia Experimental (NUBEX), da Universidade de Fortaleza em parceria com o setor de Farmacologia da Universidade Federal do Ceará para algumas análises de experimentos.

Fortaleza, 12 de abril de 2018

Prof. Dr. Ramon da Silva Raposo
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade de Fortaleza

Prof. Dr. Saulo Ellery Santos
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade de Fortaleza