



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

**RENATA LINE DA CONCEIÇÃO RIVANOR**

**EFEITOS ANTINOCICEPTIVO E ANTI-INFLAMATÓRIO DA LECTINA DA ALGA  
MARINHA VERDE *Caulerpa cupressoides* NO MODELO DE ARTRITE INDUZIDA  
POR ZYMOSAN NA ARTICULAÇÃO TEMPOROMANDIBULAR DE RATOS**

**FORTALEZA**

**2014**

**RENATA LINE DA CONCEIÇÃO RIVANOR**

**EFEITOS ANTINOCICEPTIVO E ANTI-INFLAMATÓRIO DA LECTINA DA ALGA  
MARINHA VERDE *Caulerpa cupressoides* NO MODELO DE ARTRITE INDUZIDA  
POR ZYMOSAN NA ARTICULAÇÃO TEMPOROMANDIBULAR DE RATOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Norma Maria Barros Benevides.

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Hellíada Vasconcelos Chaves.

FORTALEZA

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

- 
- R517e Rivanor, Renata Line da Conceição.  
Efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório da lectina da alga marinha verde *caulerpa cupressoides* no modelo de artrite induzida por zymosan na articulação temporomandibular de ratos. / Renata Line da Conceição Rivanor. – 2014.  
101 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2014.  
Área de Concentração: Bioquímica vegetal.  
Orientação: Profa. Dra. Norma Maria Barros Benevides.  
Coorientação: Dra. Heliáda Vasconcelos Chaves.
1. Alga Marinha. 2. Inflamação. 3. Medição da dor I. Título.

RENATA LINE DA CONCEIÇÃO RIVANOR

**EFEITOS ANTINOCICEPTIVO E ANTI-INFLAMATÓRIO DA LECTINA DA ALGA  
MARINHA VERDE *Caulerpa cupressoides* NO MODELO DE ARTRITE INDUZIDA  
POR ZYMOSAN NA ARTICULAÇÃO TEMPOROMANDIBULAR DE RATOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Aprovada em: 31/01/2014

BANCA EXAMINADORA



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Norma Maria Barros Benevides (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Hellíada Vasconcelos Chaves (Coorientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)- *Campus* Sobral



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ianna Wivianne Fernandes de Araújo  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

À minha família, em especial minha mãe  
Delma.

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof<sup>ª</sup> Norma Maria Barros Benevides por ter me recebido de braços abertos em seu Laboratório, pela orientação, suporte e incentivo nos momentos difíceis.

À Prof<sup>ª</sup>. Hellíada Vasconcelos Chaves por ter aceitado me coorientar, por ter aberto as portas do seu laboratório e da sua casa em Sobral, pelo companherismo, gentileza, apoio e ensinamentos dados ao longo do mestrado.

À Prof<sup>ª</sup>. Mirna Marques Bezerra, pela hospitalidade e atenção durante o período que estive no Laboratório de Farmacologia - Campus Sobral/UFC.

Aos amigos do Laboratório de Farmacologia do Campus Sobral/UFC, em especial, a Danielle Val, Alice, Jonas, Raul e Rodrigo pela imensa ajuda nos experimentos ao longo do mestrado. Sem o auxílio de vocês não teria conseguido.

À Prof<sup>ª</sup>. Karura Maria Alves Pereira, da faculdade de Odontologia- Campus Sobral/UFC pela contribuição na realização das análises histológicas.

À Prof<sup>ª</sup>. Ianna Wivianne Fernandes de Araújo pela atenção, disponibilidade, amizade, ensinamentos e pela gentileza de integrar a banca examinadora deste trabalho.

A todos os amigos do Laboratório de Carboidratos e Lectinas (Carbolec): Ana Luíza, Ariévilo Rodrigues, Beatriz Souza, Chistiane Oliveira, Clara, Felipe Barros, Gerardo Carneiro, Natássia Ribeiro, Neto Silva, Patu Servente, Ravel Dias, Ricardo Silva e Ticiania Lima pela amizade construída e ensinamentos adquiridos.

Em especial, agradeço ao meu amigo e companheiro de mestrado Valdécio Silvano, ao Ismael Queiroz, ao Willame da Silva e a Ticiania Abreu pela ajuda durante a extração e purificação da lectina, amizade e parceria.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, por terem contribuído para a minha formação profissional e pessoal.

A todos os colegas da minha turma de mestrado, em especial Antonio, Joana, Aline e Iara, pelo incentivo e companherismo.

Aos meus queridos amigos de hoje e de sempre, Kaira Emanuela pelo o apoio incondicional, Luciana Bastos, Tuelly Bandeira, Daniele Holanda, Priscila Azevedo, Tarcila Emanoela, Eder Lopes, que sempre estiveram comigo, mesmo em caminhos diferentes, trazendo carinho, alegria e conforto. Vocês são presentes de Deus em minha vida!

Ao meu amor, Guilherme Teixeira, por está sempre ao meu lado me incetivando e apoiando, pela sua compreensão e amor.

À minha família, pelo carinho, admiração e por acreditar sempre em mim, em especial à minha Mãe, que é sempre uma fonte inesgotável de estímulo e incentivo, que com muito orgulho levanta minha bandeira e me dar forças para prosseguir. Ela é minha maior fã. Obrigada pelo amor incondicional, paciência e confiança. Perdoe-me por não está sempre presente. A senhora e meu irmão são essenciais, meu tudo, minha vida. Amo Vocês!

À Deus, que possibilita tudo, que me deu a vida e a capacidade de realizar meus objetivos, abençoando sempre a minha caminhada.

À Universidade Federal do Ceará (UFC); ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica; à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio e custeio de projetos desenvolvidos no Carbolec; ao Conselho Nacional de desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação Cearense de Amparo à Pesquisa (FUNCAP), pelo custeio de projetos realizados no Carbolec.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

“Peçam e receberão; procurem e acharão; batam e a porta se abrirá. Porque todos aqueles que pedem recebem; aqueles que procuram acham; e a porta se abre para quem bate... Vocês, mesmo sendo maus, sabem dar coisas boas aos seus filhos. Quanto mais o Pai que está no céu dará coisas boas aos que lhe pedirem.”

(Mateus 7:1)

## RESUMO

As algas marinhas são fontes de compostos bioativos para a indústria farmacêutica e dentre esses compostos destacamos as lectinas. O presente trabalho teve como objetivo investigar os efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório da lectina da alga marinha verde *Caulerpa cupressoides* (LCc) no modelo de artrite induzida por zymosan (Zy) na articulação temporomandibular (ATM) de ratos. LCc foi extraída com tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5 e isolada por cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose. Nos ensaios de artrite induzida por Zy, ratos *Wistar* machos receberam LCc (0,1; 1 ou 10 mg/kg; i.v.) ou salina estéril, 30 min antes da injeção intra-articular (i.art.) de Zy (2 mg/art., 40 µL) na ATM esquerda. Grupos controles receberam salina estéril (40 µL; i.art.), indometacina (5 mg/kg; s.c) ou morfina (5 mg/kg, s.c.). Grupos de animais receberam LCc (10 mg/kg, i.v.) associada à mucina (100 mg/kg, i.v.), um açúcar inibidor, e outro grupo recebeu somente mucina antes dos estímulos. Para analisar o envolvimento da via da HO-1 na artrite, os animais foram pré-tratados (3 mg/kg, s.c.) com um inibidor específico do grupo heme (zinco protoporfirina IX – ZnPP IX). Finalmente, para avaliar se o efeito antinociceptivo de LCc estava envolvido na ativação do sistema opioide, grupo de animais receberam uma injeção i.art. (10 µg/art.;15 µL) de um antagonista de receptores opioides (naloxona), 35 min antes da injeção de Zy. Após 5 min, os animais foram pré-tratados com LCc (10 mg/kg). A hipernocicepção mecânica foi medida utilizando o método de Von Frey elétrico no tempo basal e 4 h após a injeção de Zy. Na 6<sup>a</sup> hora, os animais foram eutanasiados e suas ATM lavadas para coleta do lavado sinovial e realização da contagem total de células e dosagem de mieloperoxidase (MPO). Posteriormente, as ATM foram removidas para as análises histológicas e imunohistoquímica (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e HO-1), além da dosagem de IL-1 $\beta$  no tecido periarticular e gânglio trigeminal. O pré-tratamento com LCc (0,1, 1 ou 10 mg/kg; i.v.) reduziu significativamente a hipernocicepção induzida por Zy (81, 83 e 89,5%, respectivamente) e inibiu o influxo de leucócitos (77,3, 80,7 e 98,5%, respectivamente) comparado ao grupo Zy, sendo confirmada pela atividade de MPO. O açúcar inibidor (mucina) não foi capaz de inibir o efeito anti-inflamatório e antinociceptivo de LCc na artrite induzida por Zy. Observamos que durante a análise histológica da ATM, os animais tratados com LCc apresentaram uma redução significativa do influxo celular na membrana sinovial. Além disso, LCc reduziu significativamente a produção de IL-1 $\beta$  no tecido periarticular e a expressão de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e HO-1 na membrana sinovial durante o ensaio de imunohistoquímica. O tratamento com ZnPP IX não foi capaz de inibir os efeitos de LCc, mostrando que sua ação antinociceptiva e

anti-inflamatória não ocorre pela via da HO-1. Além disso, o tratamento com naloxona não reverteu o efeito de LCc. Portanto, LCc apresentou efeito antinociceptivo e anti-inflamatório no modelo de artrite induzida por Zy, reduzindo a produção de citocinas primárias (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ), porém sua ação antinociceptiva não ocorre pelo mecanismo opioide periférico.

**Palavras-chave:** algas marinhas; inflamação; nocicepção; disfunção temporomandibular.

## ABSTRACT

Seaweeds are sources of bioactive compounds for the pharmaceutical industry and among these compounds include the lectins. The present study aimed to investigate the effects antinociceptive and anti-inflammatory of the lectin of the green seaweed *Caulerpa cupressoides* (CcL) on model of zymosan-induced arthritis in the temporomandibular joint (TMJ) of rats. CcL was extracted with 25 mM Tris-HCl buffer pH 7.5 and isolated by ion exchange chromatography on DEAE-cellulose column. In tests of arthritis induced by Zy, male *Wistar* rats received CcL (0.1, 1 or 10 mg/kg, i.v.) or sterile saline, 30 min before the intra-articular (i.art.) injection of Zy (2 mg/art.; 40  $\mu$ L) into the left TMJ. Control groups received saline (40  $\mu$ L; i.art.), indomethacin (5 mg/kg, s.c.) or morphine (5 mg/kg, s.c.). Groups of animals received CcL (10 mg/kg; i.v.) associated with mucin (8 mg/kg; i.v.), a sugar inhibitor, and another group received only mucin before stimulus. To analyze the involvement of HO-1 pathway in arthritis, animals were pretreated (3 mg/kg, s.c.) with a specific inhibitor of heme (zinc protoporphyrin IX-ZnPP IX). Finally, to evaluate the analgesic effect of CcL in the activation of the opioid system, group of animals received an injection i.art. (10  $\mu$ g/art.; 15  $\mu$ L) of the opioid receptor antagonist (naloxone), 35 min before injection of Zy. After 5 min, the animals were pretreated with CcL (10 mg/kg). Mechanical hypernociception was recorded before the i.art. injections of Zy or saline and after 4h. After 6 hour, the synovial fluid was collected to perform cell counting and myeloperoxidase (MPO) assay. Also, TMJ tissues were excised to perform histopathological, immunohistochemistry (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e HO-1) and cytokine assays (IL-1 $\beta$ ) in the periarticular tissue and trigeminal ganglion. Pretreatment with CcL (0.1, 1 or 10 mg/kg; i.v.) inhibited ( $p < 0.05$ ) the nociceptive response (81, 83, and 89.5%, respectively) and reduced the influx of leukocytes (77.3, 80.7 and 98.5%, respectively) compared to Zy group, as demonstrated by MPO activity. Sugar inhibitor (mucin) did not inhibit the anti-inflammatory and antinociceptive effect of CcL in arthritis induced by Zy. We observed that during the histological analysis of ATM, animals treated with CcL showed a significant reduction of cell influx in the synovial membrane. Furthermore, CcL significantly reduced the production of IL-1 $\beta$  in the periarticular tissue and expression of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and HO-1 in the synovial membrane during immunohistochemistry assay. Treatment with ZnPP IX was not able to inhibit the effect CcL, indicating that its antinociceptive and anti-inflammatory action did not occur HO-1 pathway. In addition, treatment with naloxone did not reverse the effect of CcL. Therefore, CcL showed antinociceptive and anti-inflammatory effect on model of Zy-induced arthritis, reducing the

production of primary cytokines (TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ ), however its antinociceptive action did not occur by peripheral opioid mechanism.

**Keywords:** seaweed; inflammation; nociception; temporomandibular disorder.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Anatomia do Complexo Trigeminal no Tronco Encefálico.....	22
Figura 2 –	Participação de Células e de Mediadores Inflamatórios na Dor Orofacial.....	23
Figura 3 –	Músculos Mastigatórios e Articulação Temporomandiular.....	29
Figura 4 –	Classificação Estrutural das Lectinas.....	41
Figura 5 –	Alga Marinha Verde <i>Caulerpa cupressoides</i> var. <i>lycopodium</i> . Classificação Taxnômica.....	47
Figura 6 –	Esquema de Extração e Purificação da Lectina da Alga Marinha Verde <i>C. cupressoides</i> (LCc).....	50
Figura 7 –	Cromatografia de Troca Iônica em Coluna de DEAE-Celulose do Extrato Total da Alga <i>C. cupressoides</i> .....	57
Figura 8 –	Efeito Antinociceptivo da LCc na Hipernocicepção Mecânica Induzida por Zy na ATM de ratos.....	58
Figura 9 –	Efeito da LCc na Contagem de Células do Lavado Sinovial da ATM de Ratos.....	60
Figura 10 –	Efeito da LCc sobre a Atividade da MPO no Fluido Sinovial na Artrite Induzida por Zy na ATM de Ratos.....	61
Figura 11 –	Fotomicrografias da ATM de Ratos com Artrite Induzida por Zy e Tratados com LCc.....	62
Figura 12 –	Efeito da LCc Associado à Mucina no Modelo de Artrite Induzida por Zy na ATM de Ratos.....	66
Figura 13 –	Efeito de LCc na Produção de IL-1 $\beta$ no Tecido Periarticular (A) e no Gânglio Trigeminal (B) da ATM de Ratos com Artrite Induzida por Zy.....	67
Figura 14 –	Fotomicrografias da Membrana Sinovial da ATM de Ratos com Artrite Induzida por Zy Análise de Imunohistoquímica para o TNF- $\alpha$ .....	71
Figura 15 –	Fotomicrografias da Membrana Sinovial da ATM de Ratos com Artrite Induzida por Zy Análise de Imunohistoquímica para o IL-1 $\beta$ .....	72

Figura 16 – Efeito de LCc no Ensaio da Via da HO-1 com ZnPP-IX na Hipernocicepção Mecânica (A), o Influxo de Leucócitos (B) e a Atividade de MPO (C) na Artrite Induzida por Zy.....	76
Figura 17 – Fotomicrografias da Análise Histopatológica da ATM de Ratos com Artrite Induzida por Zy quando Pré-tratados com ZnPP IX e LCc.....	78
Figura 18 – Fotomicrografias da Membrana Sinovial da ATM de Ratos com Artrite Induzida por Zy durante Análise de Imunohistoquímica para HO-1.....	79
Figura 19 – Avaliação do Envolvimento dos Receptores Opioides Periféricos no Efeito Antinociceptivo de LCc na Hipernocicepção Mecânica Induzida por Zy na ATM de Ratos.....	81

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Análise Histológica da ATM de Ratos com Artrite Induzida por Zy e Tratados com LCc.....	60
Tabela 2 – Análise Histológica da ATM de Ratos com Artrite Induzida por Zy quando Pré-tratados com ZnPP IX e LCc.....	76

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINEs	Anti-inflamatórios Não-esteroidais
ANOVA	Análise de Variância
AMPA	Alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico
ATM	Articulação Temporomandibular
ATP	Trifosfato de adenosina
BSA	Albumina Séria Bovina
BVD	Biliverdina
CEPA	Comissão de Ética em Pesquisa Animal
CO	Monóxido de Carvão
COX	Cicloxigenase
DEAE	Dietilaminoetil
DTM	Disfunção Temporomandibular
EDTA	Ácido Etilenoaminotetracético
E.P.M.	Erro Padrão da Média
GAGs	Glicosaminoglicanos
HCl	Ácido Clorídrico
HE	Hematoxilina-Eosina
HO-1	Heme oxigenase-1
IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor
IL	Interleucina
IL- 1 $\beta$	Interleucina 1-beta
i.art.	Intra-articular
i.p.	Intraperitonal
i.v.	Intravenosa
kDa	Quilodáltons
LCc	Lectina de <i>Caulerpa cupressoides</i>
$\mu$ g	Micrograma
$\mu$ L	Microlitro
MMP	Metaloproteinases de Matriz
MPO	Mieloperoxidase
nm	Nanômetro

NMDA	N-metil D-Aspartato
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintase
PAF	Fator de Ativação Plaquetar
PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida
PBS	Tampão Fosfato
PG	Prostaglandina
PGI <sub>2</sub>	Prostaciclina
pH	Potencial Hidrogeniônico
s.c.	Subcutânea
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SNC	Sistema Nervoso Central
TB	Tampão Tris –HCl 25 mM, pH 7,5
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral Alfa
UH	Unidades de Hemaglutinação
ZnPP IX	Zinco Protoporfirina IX
Zy	Zymosan

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	20
<b>1.1</b>	<b>Dor Orofacial</b> .....	20
<b>1.2</b>	<b>Disfunção Temporomandibular</b> .....	24
<b>1.3</b>	<b>Articulação Temporomandibular</b> .....	26
<b>1.4</b>	<b>Mediadores Inflamatórios Envolvidos na Dor da Articulação Temporomandibular</b> .....	29
<b>1.5</b>	<b>Artrite Induzida por Zymosan</b> .....	34
<b>1.6</b>	<b>Fármacos Utilizados nas Disfunções Temporomandibulares</b> .....	35
<b>1.7</b>	<b>Algas Marinhas</b> .....	39
<i>1.7.1</i>	<i>Lectinas</i> .....	40
<i>1.7.1.1</i>	<i>Lectinas de Algas Marinhas</i> .....	42
<i>1.7.1.2</i>	<i>Atividades Biológicas das Lectinas de Algas Marinhas</i> .....	43
<i>1.7.1.3</i>	<i>Lectina da Alga Marinha Verde <i>Caulerpa cupressoides</i></i> .....	44
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	46
<b>2.1</b>	<b>Geral</b> .....	46
<b>2.2</b>	<b>Específicos</b> .....	46
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	47
<b>3.1</b>	<b>Materiais</b> .....	47
<i>3.1.1</i>	<i>Alga Marinha</i> .....	47
<i>3.1.2</i>	<i>Células Sanguíneas</i> .....	47
<i>3.1.3</i>	<i>Animais</i> .....	48
<i>3.1.4</i>	<i>Soluções, Drogas e Reagentes</i> .....	48
<b>3.2</b>	<b>Métodos</b> .....	49
<i>3.2.1</i>	<i>Extração e Purificação da Lectina da Alga Marinha Verde <i>C. cupressoides</i></i> .....	49
<i>3.2.1.1</i>	<i>Preparação do Extrato Total</i> .....	49
<i>3.2.1.2</i>	<i>Cromatografia de Troca Iônica em Coluna de DEAE-Celulose</i> .....	49
<i>3.2.2</i>	<i>Determinação da Atividade Hemaglutinante</i> .....	50
<i>3.2.3</i>	<i>Estudo dos efeitos Antinociceptivo e Anti-inflamatório de LCc na Artrite da Articulação Tempomandibular de Ratos por Zymosan</i> .....	51
<i>3.2.3.1</i>	<i>Avaliação da Hipernocicepção Mecânica</i> .....	51
<i>3.2.3.2</i>	<i>Contagem do Influxo Celular no Lavado Sinovial</i> .....	52

3.2.3.3	Determinação da Atividade da Mieloperoxidase.....	52
3.2.3.4	Análise Histológica da Articulação Temporomandibular.....	53
3.2.3.5	Domínio lectínico da LCc .....	53
3.2.3.6	Dosagem da Citocina IL-1 $\beta$ .....	53
3.2.3.7	Imunohistoquímica da ATM para TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ e HO-1.....	54
3.2.3.8	Avaliação do Possível Envolvimento da Via da HO-1 na Resposta Nociceptiva e Inflamatória.....	55
3.2.3.9	Análise do Envolvimento da Via Opioide Durante o Efeito da LCc na Nocicepção.....	55
3.2.4	<i>Análise Estatística dos Dados</i> .....	56
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>57</b>
<b>4.1</b>	<b>Extração e Purificação da Lectina da Alga Marinha Verde <i>Caulerpa cupressoides</i></b> .....	<b>57</b>
<b>4.2</b>	<b>Efeitos Antinociceptivo e Anti-inflamatório de LCc no Modelo de Artrite Induzida por Zy na ATM de ratos</b> .....	<b>58</b>
4.2.1	<i>Análise do Domínio Lectínico da LCc</i> .....	65
4.2.2	<i>Avaliação da Dosagem da Citocina IL-1<math>\beta</math></i> .....	67
4.2.3	<i>Imunohistoquímica para IL-1<math>\beta</math> e TNF-<math>\alpha</math></i> .....	70
<b>4.3</b>	<b>Avaliação do Envolvimento da Via da HO-1 nas Atividades Antinociceptiva e Anti-inflamatória da LCc</b> .....	<b>75</b>
<b>4.4</b>	<b>Análise da Participação dos Receptores Opioides Periféricos no Efeito Antinociceptivo da LCc</b> .....	<b>81</b>
	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>83</b>
	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>84</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>85</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Dor Orofacial

A Associação Internacional para os Estudos da Dor (IASP, 2008), define a dor como uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a dano tecidual real ou potencial ou descrita em termos desse dano, estando presente no processo inflamatório e exercendo também papel de defesa e alerta do organismo. A dor é um dos sinais clássicos do processo inflamatório e decorre, inicialmente, da sensibilização dos nociceptores, além de estar presente como sintoma de muitas desordens clínicas, que afetam uma grande parcela da população, causando prejuízos à qualidade de vida (PORRECA et al., 2002; VERRI-JUNIOR et al., 2006).

A dor orofacial, por sua vez, é descrita como condições dolorosas associadas a tecidos moles ou mineralizados da cavidade oral e da face ou descrita como dores referidas a essa região envolvendo estruturas como pele, vasos sanguíneos, ossos, dentes, periodonto, articulações, glândulas, estruturas nervosas, músculos, córnea, meninges, seios da face e mucosa nasal, segundo a Sociedade Brasileira de Cefaleia (SBC, 2010). A dor orofacial envolve um grande grupo de condições como disfunção temporomandibular, cefaleias secundárias, neuropatias, dores odontogênicas e advindas da mucosa oral e dor facial idiopática (NEUBERT et al., 2005; SHINAL & FILLINGIM, 2007). As características comuns de tais condições são a hiperalgesia mecânica primária ou hipersensibilidade no local da lesão e a hiperalgesia mecânica secundária, assim como pode ocorrer alodinia (SHIBUTA et al, 2012).

A dor na região oral ou craniofacial representa um dos maiores problemas de saúde pública, sua presença pode comprometer a qualidade de vida dos pacientes, alterando as atividades profissionais, afetando as relações emocionais, sociais e familiares e implicando ainda aumento dos gastos financeiros para os serviços públicos de saúde. Apresenta etiologia diversa como tensão muscular excessiva, tratamento cirúrgico ou dentário, traumas, hábitos parafuncionais, uso de aparelhos ortodônticos, próteses mal adaptadas, estresse, ansiedade e doenças osteoarticulares e musculoesqueléticas (OKESON, 1998; HARGREAVES, 2011; MONTEIRO et al., 2011).

Estudos demonstram que a dor orofacial possui um alto grau de prevalência na população mundial (HARGREAVES, 2011), atingindo pelo menos 10% da população na fase adulta, sendo que esse risco aumenta para mais de 50% nos idosos. Além disso, pacientes do

sexo feminino estão mais propensos às formas crônicas das dores orofaciais, como por exemplo, as disfunções temporomandibulares e neuralgia do trigêmeo (OBERMANN, 2010). No entanto, a dor orofacial pode atingir indivíduos mais jovens (HARGREAVES, 2011). Em um estudo realizado no Brasil com crianças com 12 anos de idade, encontrou-se uma prevalência de 66,6% de dor orofacial associada à alta prevalência de cárie em relação à população estudada (TRAEBERT et al., 2005).

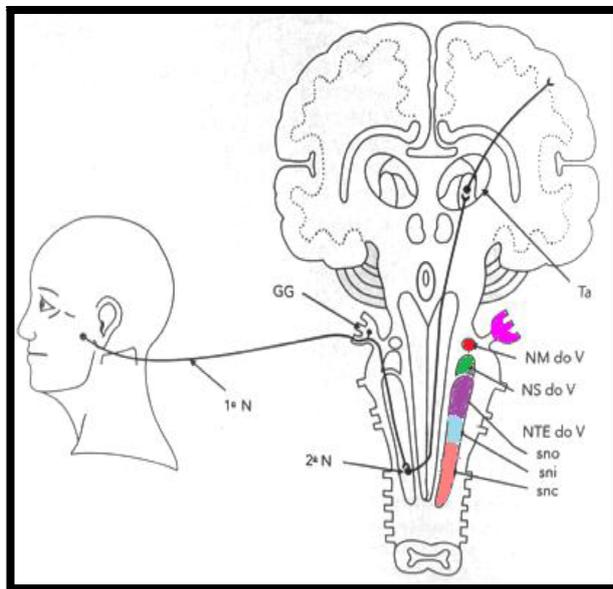
A percepção da dor na região oral e craniofacial envolve mecanismos periféricos e centrais (RACICH, 2005). A dor é transmitida através de impulsos nociceptivos levados da periferia ao Sistema Nervoso Central (SNC) e para os centros superiores do tronco encefálico (tálamo e córtex somatosensorial). No caso da dor orofacial, a informação nociceptiva é conduzida através das fibras nervosas aferentes primárias (A $\delta$  e C) enviando informações para o complexo nuclear sensorial trigeminal no tronco encefálico (MATTHEWS & SESSLE, 2002). Esse impulso sensitivo é transmitido principalmente por meio do V par de nervos cranianos, o nervo trigêmeo, composto por três ramificações: oftálmica, maxilar e mandibular. Os corpos celulares dos neurônios aferentes trigeminais estão localizados no gânglio trigeminal, que é estruturalmente semelhante ao gânglio do corno dorsal da medula espinal. Os impulsos transmitidos pelo nervo trigeminal entram diretamente no tronco encefálico na região da ponte fazendo sinapse com os neurônios de segunda ordem no núcleo trigeminal (DAVIES et al., 2010; WAITE & ASHWELL, 2004; SESSLE, 2002; OKESON, 2003).

O complexo trigeminal do tronco encefálico é dividido anatômica e funcionalmente em núcleo sensorial principal, local de transmissão das sensações de tato e propriocepção; núcleo motor, envolvido nas respostas motoras e, núcleo do trato espinal do trigêmeo, o qual compreende três subnúcleos: oral, interpolar e caudal (**Figura 1**). Este último é o principal sítio de informação nociceptiva do tronco cerebral e, por possuir similaridades com o corno dorsal espinal, é denominado corno dorsal medular (TAKEMURA, 2006; OKESON, 2003; REN & DUBNER, 2011).

Antes da informação nociceptiva ascender ao tálamo e córtex cerebral, ocorre uma modulação tanto para suprimir quanto para amplificar a informação nociceptiva nos terminais centrais das fibras aferentes (SESSLE, 2000). Essa modulação é composta por um grupo de estruturas no tronco encefálico, mesencéfalo, subcórtex e córtex que formam um sistema de projeções descendentes para o complexo trigeminal do tronco encefálico e corno dorsal da medula espinal (MATTHEWS & SESSLE, 2002; OKESON, 2003). Para a supressão da informação, podem ser liberados peptídeos opioides endógenos como endorfinas, encefalinas e dinorfinas que atuam em receptores opioides, liberação de serotonina, ácido  $\gamma$ -aminobutírico

(GABA), glicina e dopamina inibindo a passagem do impulso nociceptivo. Já para amplificação, pode ocorrer a liberação de neurotransmissores estimulatórios como glutamato e aspartato atuando nos receptores ionotrópicos NMDA e AMPA, ATP em receptores  $P_2X$ , substância P agindo em receptores das neurocininas, norepinefrina atuando em receptores alfa-adrenérgicos presentes nos neurônios centrais, dentre outros (OKUBO, 2013; MATTHEWS & SESSLE, 2002; OKESON, 2003; BASBAUM et al., 2009).

**Figura 1- Anatomia do Complexo Trigeminal no Tronco Encefálico.** GG: Gânglio trigeminal, NM do V: núcleo motor do complexo trigeminal, NS do V: núcleo sensitivo principal do complexo trigeminal, NTE do V: núcleo do trato espinhal do complexo trigeminal, sno: subnúcleo oral, sni: subnúcleo interpolar, snc: subnúcleo caudal, Ta: tálamo.



Fonte: Adaptado de OKESON, 2003.

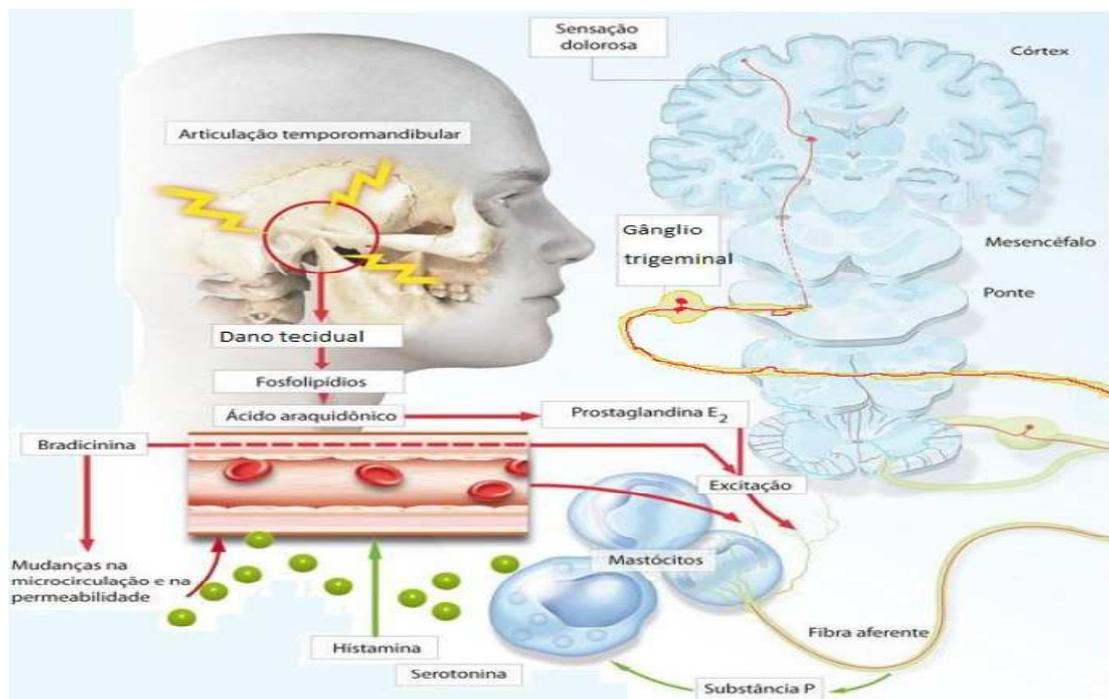
Quando a informação nociceptiva, finalmente, chega aos núcleos talâmicos, de onde partem aferências para o córtex somestésico (local onde a intensidade e a localização são processadas), juntamente com as informações advindas do córtex somestésico secundário e do sistema límbico, a sensação tem um significado sendo percebida como dor (RACICH, 2005; OKESON, 2003).

Os neurônios no gânglio da raiz dorsal também podem ser estimulados pelas células gliais satélite que permeiam corpos neuronais, aumentando sua excitabilidade ao liberar mediadores inflamatórios, tais como o fator de necrose tumoral ( $TNF-\alpha$ ), neuropeptídeos, óxido nítrico (NO) e glutamato. ATP e outros nucleotídeos extracelulares também participam da transmissão da dor, tanto em condições normais como patológicas (VILLLA et al., 201).

A sensibilização periférica dos nociceptores ou hiperalgesia primária se deve, pelo menos em parte, à ação de mediadores inflamatórios (FERREIRA et al., 1978). Em uma primeira fase de sensibilização dos nociceptores, durante a resposta inflamatória, mediadores proteicos (citocinas), lipídicos (prostaglandinas (PGs)), NO e histamina, oriundos de células residentes e recrutadas; bradicinina, oriunda da cascata plasmática, e neuropeptídeos, advindos das terminações nervosas, são responsáveis pela manutenção e amplificação do processo inflamatório. Enquanto algumas dessas substâncias (histamina e bradicinina) são capazes de ativar diretamente os nociceptores, outras, como as PGs, são capazes de sensibilizar diretamente esses receptores (**Figura 2**) (NOGUSHI & OKUBO, 2011; VERRI-JUNIOR et al., 2006).

Geralmente, as superfícies articulares não são inervadas e, por isso, incapazes de iniciar uma resposta sensitiva. Desta forma, a dor oriunda da Articulação Temporomandibular (ATM) pode emanar das estruturas de tecidos moles da articulação ou dos tecidos ósseos. A dor que emana das estruturas ósseas, em geral, ocorre somente após a perda da superfície articular fibrosa da articulação. Quando isto ocorre, é comumente chamada de artrite. As demais dores são denominadas artralguas (dor articular) (DE LEEW, 2013).

**Figura 2- Participação de Células e de Mediadores Inflamatórios na Dor Orofacial.**



Fonte: Adaptado de OKESON, 1998.

## 1.2 Disfunção Temporomandibular

Ao longo dos anos, os transtornos funcionais do sistema mastigatório têm sido identificados através de diversos termos. Em 1934, James Costen descreveu um grupo de sintomas situados ao redor do ouvido e na ATM, como sendo denominada de “Síndrome de Costen”, surgindo posteriormente o termo Transtornos Temporomandibulares de acordo com Bell, 1982.

A Associação Americana de Dor Orofacial reconhece que as Disfunções Temporomandibulares (DTM) englobam um grupo de condições musculoesqueléticas e neuromusculares envolvendo as ATM, os músculos mastigatórios e todos os tecidos associados. Os sinais e sintomas associados com essas disfunções são diversos, e podem incluir dificuldade em mastigar e falar, ou outras funções orofaciais. Estão frequentemente associadas com dor aguda ou persistente e, o paciente também pode sofrer de outras desordens dolorosas (comorbidades). As formas crônicas das DTM dolorosas podem acarretar afastamento ou incapacidade no trabalho ou de atividades sociais, resultando em diminuição da qualidade de vida de forma geral (GREENE et al., 2010).

Dentre os sinais associados a essa desordem, a dor aparece como um achado mais frequente e é um dos mais importantes sintomas de pacientes com DTM, representando uma fonte comum de dor orofacial crônica (TING et al., 2007; BAGIS et al., 2012). Trabalhos têm relatado que a inflamação articular exerce o papel de sensibilizar nociceptores, causando hiperalgesia e aumentando a excitabilidade dos neurônios aferentes primários. A dor articular pode, ainda, causar hiperatividade dos músculos mastigatórios, o que perpetua a condição da dor facial (TAKEUCHI et al., 2004; TAKEDA et al., 2006). Outros sintomas associados à DTM são cefaleia secundária, dor cervical, sintomas otológicos como zumbido, otalgia e distúrbios do sono (TROELTZSCH et al., 2011).

Estudos epidemiológicos têm mostrado que 40 a 70% dos indivíduos podem apresentar sinais e sintomas de DTM, enquanto que 80% têm ou tiveram dor facial. Aproximadamente 6% destas pessoas têm sintomas graves o suficiente para exigir tratamento. A alta prevalência do gênero feminino nos grupos de pacientes portadores de DTM é enfatizada em vários estudos. As características da dor em homens que se apresentam para o tratamento são semelhantes às mulheres em tratamento (SHAEFER et al., 2013).

No Brasil, poucos são os trabalhos que verificaram a prevalência de sinais e sintomas de DTM em amostras populacionais. Um estudo epidemiológico, realizado na cidade de Ribeirão Preto-SP por Gonçalves et al. (2010), detectou pelo menos um sinal de

DTM em 39,2% da população, sendo a presença de ruídos na ATM o mais comum sintoma observado, seguido pela dor articular ou nos músculos mastigatórios (25,6%) da população. Os autores relataram uma maior prevalência dos sintomas na população urbana e de maior frequência em mulheres.

Bezerra et al. (2012) realizaram uma pesquisa com 336 acadêmicos brasileiros de diferentes cursos, na qual foi verificado a presença, grau e sintomas de DTM, entre outros. A prevalência de DTM, nos seus diferentes graus, ficou estabelecida com 62,5% dos universitários. Entre os que possuíam o diagnóstico de DTM, 48,2% apresentaram um grau leve, 11,3% moderado e apenas 3% um grau grave.

A etiologia é um dos aspectos relacionados à DTM que provoca controvérsias, uma vez que pode sofrer ação direta ou indireta de vários fatores. Assim, é correto afirmar que a etiologia dessa desordem é multifatorial, dentre as quais estão incluídos: traumas na região de face e pescoço; hábitos parafuncionais como mascar chicletes, onicofagia, hábito de morder objetos e bruxismo; hábitos posturais e hábitos ocupacionais (MANFREDINI et al., 2003; SHAEFER et al., 2013). Fatores psicológicos como ansiedade, depressão e estresse também têm grande correlação (WU et al., 2013). Envolvimento de alterações sistêmicas relacionadas primariamente com doenças reumatológicas, como esclerose sistêmica, lúpus eritematoso sistêmico e artrite reumatoide, assim como fibromialgia, são importantes de serem investigados (FREDRIKSSON et al., 2003).

A Associação Americana de Dor Orofacial (AAOP) estabeleceu novas diretrizes para o diagnóstico e classificação das diferentes formas de DTM, que são divididas em dois grandes grupos, DTMs musculares e articulares. As disfunções musculares estão classificadas como dor muscular limitada a região orofacial, incluindo: mialgia, tendinite, miosite e espasmo; contratura que pode ser muscular ou tendinosa; hipertrofia; neoplasia; distúrbios de movimento e, por fim, mialgia mastigatória atribuída a distúrbios centrais ou sistêmicos. Já as disfunções articulares estão classificadas como dor articular, incluindo artralgia e artrite; distúrbios articulares como a do complexo côndilo disco, outras distúrbios de hipomobilidade e distúrbios de hiper mobilidade; doenças articulares como doença articular degenerativa, condilose, osteocondrose dissecante, osteonecrose, artrite sistêmica (artrite reumatoide), neoplasia e condromatose sinovial; fratura e distúrbios congênitos ou de desenvolvimento (DE LEEUW, 2013).

Artrite é uma das formas mais severas de DTM. É considerada dessa maneira devido à degeneração articular provocada, caracterizada pela perda progressiva da cartilagem articular, hipertrofia e deformação do osso subcondral e por inflamação secundária da

membrana sinovial (ATSÜ & AYHAN-ARDIC, 2006; NOZAWA-INOUE et al., 2003; TANAKA et al., 2008). Nas populações ocidentais ela é uma das mais frequentes causas de dor, perda da função e afastamento das atividades laborais em adultos (ARDEN, 2006). A etiologia ainda é desconhecida, porém, vários estudos sugerem o envolvimento de fatores comportamentais, genéticos e doenças sistêmicas (BARTOK & RIRESTEIN, 2010).

De acordo com a Associação Americana de Dor Orofacial, recomenda-se enfaticamente que, o tratamento da DTM deve ser realizado quando existem indicações específicas e justificadas. Portanto, o tratamento inicial das DTM deve ser baseado no uso de modalidades terapêuticas conservadoras, reversíveis e baseadas em evidências. Estudos sobre a história natural de muitas DTM sugerem que elas tendem a melhorar ou se resolver com o passar do tempo. Apesar de nenhuma terapia específica ser uniformemente efetiva, muitas terapias conservadoras mostram-se efetivas em proporcionar alívio sintomatológico com relação as formas de tratamentos invasivos. Pelo fato dessas modalidades terapêuticas não produzirem modificações irreversíveis, elas apresentam menos riscos de causar malefícios (GREENE, 2010).

As modalidades de tratamento existentes incluem terapias com placas oclusais, terapias físicas (termoterapia, laser, ultra-som, estimulação elétrica neural transcutânea-TENS), fisioterapia, terapia com exercícios, farmacoterapia, terapia cognitiva, acupuntura e procedimentos cirúrgicos como artroscopia, artrocentese, reposicionamento de disco e regularização das superfícies articulares (CRAANE et al., 2012; LIU et al., 2012; BARRETTO et al., 2013).

### **1.3 Articulação Temporomandibular**

As articulações temporomandibulares (ATM) são articulações altamente especializadas pertencente ao sistema estomatognático, no qual também fazem parte a musculatura facial, dentes, periodonto, mucosa jugal, língua, glândulas, nervos e vasos sanguíneos (BARRETTO, 2013; OKESON, 2008). Essas estruturas são responsáveis por desenvolverem, em conjunto, atividades cruciais para a vida do indivíduo como mastigação, deglutição, respiração, fala e expressão emocional (KITSOULIS et al., 2011; RANDO & WALDRON, 2012). Qualquer alteração de uma dessas estruturas poderá resultar em mau funcionamento desse sistema e prejudicar sobremaneira a qualidade de vida dos indivíduos acometidos (SIQUEIRA & TEIXEIRA, 2012).

A ATM é uma articulação considerada gínglimoidal, situada bilateralmente à frente do ouvido, pois compreende um movimento de rotação (dobradiça) num só plano e translação, sendo ao mesmo tempo artrodial porque realiza movimentos de deslizamento. Portanto, é tecnicamente denominada de gínglimo artrodial (OKESON, 2008). Algumas características peculiares à ATM: é uma articulação bilateral que se movimenta simultaneamente; as articulações são unidas por um único osso da mandíbula e não podem mover-se independentemente uma da outra; seu movimento não é apenas guiado pela forma dos ossos, músculos e ligamentos, mas também pela oclusão dos dentes, e apresenta metabolismo diferenciado (ALOMAR et al., 2007).

Além disso, enquanto a maioria das articulações sinoviais é revestida por cartilagem hialina a ATM é revestida de tecido conjuntivo denso fibroso, constituído de fibras de colágeno (tipos II, IX e XI) e de condrócitos, apresentando também grande quantidade de proteoglicanos e glicosaminoglicanos, que contribuem para flexibilidade da cartilagem. Esta camada fibrosa é mais resistente do que a cartilagem hialina, o que garante a ATM, diante das alterações degenerativas, uma maior capacidade de reparação e regeneração (KURODA et al., 2009; RANDO & WALDRON, 2012).

A ATM é constituída de tecidos moles e tecidos duros. Os tecidos duros são formados pela a cabeça da mandíbula (côndilo) e osso temporal (fossa mandibular e eminência articular). Já os tecidos moles são constituídos pelo disco articular, membrana sinovial, ligamentos articulares como cápsula articular, ligamentos discais e ligamento temporomandibular (**Figura 3**) (KURODA et al., 2009; RANDO & WALDRON, 2012). Trabalha em conjunto com os músculos que movimentam a mandíbula, como pterigóideo lateral superior, pterigóideo lateral inferior, masseter, temporal, pterigoideo medial, supra e infra-hioideos, que, em conjunto, realizam os movimentos excursivos mandibulares de abertura, fechamento, protrusão (movimento para frente) e lateralidade direita e esquerda, exercendo as funções do sistema mastigatório (ALOMAR et al., 2007).

O disco articular é a estrutura fibrocartilaginosa com as glicosaminoglicanas principalmente alocadas na porção central, com condrócitos em seu interior, desprovido de vasos sanguíneos e sem inervação. Está fixado à cabeça da mandíbula nos pólos medial e lateral, proporcionando à articulação movimentos livres. Possui morfologia bicôncava e funções de amortecer e distribuir pressões durante os movimentos; preencher os espaços intra-articulares, compensar as irregularidades ósseas; estabilizar os côndilos nas suas posições e movimentos funcionais e proteger a cartilagem articular e o osso subcondral (OKESON, 2008; TANAKA et al., 2008).

O disco articular encontra-se interposto entre as estruturas ósseas da ATM, sendo a região posterior denominada zona bilaminar ou retrodiscal. Essa região apresenta dois estratos, o superior, responsável pelo movimento de recolhimento do disco articular, composto de fibras elásticas, e o inferior, composto de fibras colágenas, que, por ser uma região altamente inervada e vascularizada, é uma fonte importante de dor nas disfunções temporomandibulares (DTM) que envolvam a ATM (AIKEN et al., 2012; ALOMAR et al., 2007; WILLARD et al., 2012).

A ATM possui ligamentos fundamentais de sustentação, tais como: ligamento mandíbulo ou disco-maleolar; ligamentos colaterais mediais e laterais que permitem o movimento passivo do disco em conjunto com a cabeça da mandíbula durante o movimento de translação; ligamento capsular que envolve a articulação em toda a sua extensão e retém o líquido sinovial e o ligamento temporomandibular, constituído por uma porção horizontal interna e outra porção horizontal externa, é responsável por limitar o movimento lateral da ATM de um lado e o movimento medial do lado oposto (OKESON, 2003, ALOMAR et al., 2007).

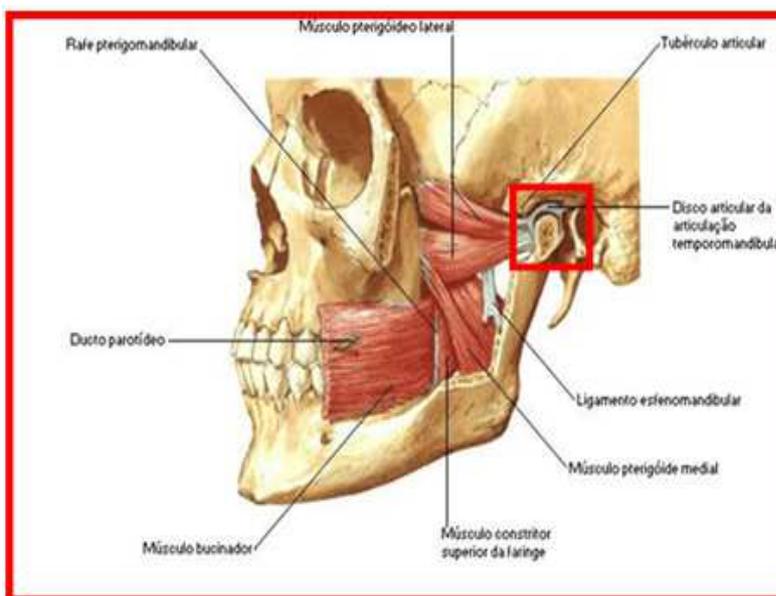
Outro constituinte importante é a membrana sinovial, a qual produz o líquido sinovial que regula as necessidades metabólicas dos tecidos, lubrifica as superfícies articulares para minimizar a fricção durante sua função e atua na defesa local ao apresentar células como linfócitos e macrófagos. A membrana sinovial reveste internamente a cápsula articular, com exceção da região em volta do disco articular e da região da cartilagem articular. Além disso, a membrana sinovial contém tipos celulares especializadas com capacidade fagocítica e imunológica, como os sinoviócitos do tipo A, semelhantes a macrófagos localizados na sua superfície interna (KOSTRZEWA-JANICKA et al., 2012).

A membrana sinovial também possui os sinoviócitos do tipo B, semelhantes aos fibroblastos, soltas em uma matriz fundamental composta de proteoglicanos, (glicosaminoglicanas: condroitina-4-sulfato e condroitina-6- sulfato como seus componentes estruturais), de ácido hialurônico, de água e de fibras colágenas. Não apresenta membrana basal para separação dos capilares, apresentando somente uma estrutura símile (laminina) e, o epitélio dos capilares ainda são fenestrados (NOZAWA-INOUE et al., 2003; OKESON, 2008).

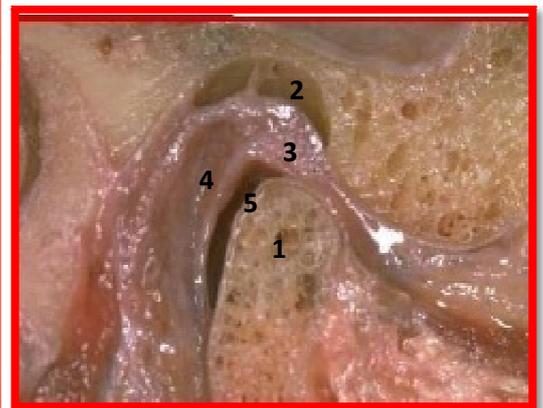
Em circunstâncias fisiológicas os condrócitos presentes na cartilagem articular produzem matriz extracelular (proteoglicanos e fibras de colágeno); os sinoviócitos produzem líquido sinovial, e a remodelação tecidual é regulada através do equilíbrio entre os níveis das enzimas metaloproteinases (MMP), que degradam a cartilagem articular e do fator tecidual

inibidor das metaloproteínas (TIMP) (KUBOTA et al., 1997,1998; SHINODA & TAKAKU, 2000; MIZUI et al., 2001). No entanto, em condições patológicas, traumas ou quando a capacidade adaptativa dos tecidos é excedida, um processo inflamatório é desencadeado, que por sua vez provoca degradação da articulação, diminuição da lubrificação, limitação do movimento mandibular e dor (ISRAEL et al., 2006).

**Figura 3. Músculos Mastigatórios e Articulação Temporomandibular.** 1. Cabeça da mandíbula, 2. Fossa mandibular do osso temporal, 3. Disco articular, 4. Zona retrodiscal, 5. Cartilagem articular.



Fonte: NETTER, 2000.



Fonte: CHAVES, 2012.

#### 1.4 Mediadores Inflamatórios Envolvidos na Dor da Articulação Temporomandibular

Estudos desenvolvidos nos últimos anos relatam a participação de diversos mediadores inflamatórios envolvidos na fisiopatologia das disfunções temporomandibulares (DTMs). A artrite caracteriza-se pela inflamação crônica das articulações associada à proliferação das células da membrana sinovial e infiltração de células inflamatórias ativadas, que incluem linfócitos T que, por sua vez, estimulam monócitos, condrócitos, macrófagos e fibroblastos sinoviais a produzirem citocinas e metaloproteínas, ocasionando destruição progressiva inicialmente da cartilagem articular e, posteriormente, do osso subcondral (FILIPPIN et al., 2008; HITCHON E EL-GABALAW, 2004; MA et al., 2011; VENKATESHA et al., 2011).

Em modelos experimentais de inflamação articular, verificou-se que as primeiras células que migram para a articulação são os neutrófilos (ROCHA; ANDRADE; JANCAR, 1996). Estas células ativadas fagocitam os imunocomplexos formados nas fases iniciais e liberam espécies reativas de oxigênio, eicosanoides e fator de ativação plaquetária (PAF) no local da inflamação (ROCHA et al., 1997). Estes mediadores ativam células residentes e infiltradas na articulação que interagem entre si e liberam outros mediadores, como citocinas (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8), interferon  $\alpha$  e  $\gamma$  (INF  $\alpha$  e  $\gamma$ ), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), assim como sistemas sinalizadores da resposta imune-inflamatória como as vias da hemeoxigenase-1 (HO-1) e do óxido nítrico (NO) (CHAVES et al., 2005; MA et al., 2011; VENKATESHA et al., 2011).

Citocinas estão diretamente relacionadas com muitos processos imunes associados com a patogênese da artrite reumatoide. Numerosas citocinas são expressas e ativas funcionalmente em tecidos sinoviais e, quando ocorre um desarranjo interno na ATM, as citocinas presentes em concentrações mais elevadas no líquido sinovial são o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e as interleucinas-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e IL-6. Essas citocinas promovem a degradação da cartilagem e articulação do osso através da ativação de condrócitos, células do disco articular, sinoviócitos tipo B (fibroblastos-símile) e fibroblastos da cartilagem articular a produzirem metaloproteinases de matriz (MMP), enzima que degrada irreversivelmente componentes da matriz extracelular (KUBOTA et al., 1997; KOSTRZEWA-JANICKA et al., 2012; MCINNES & SCHETT, 2011)

O TNF- $\alpha$  é uma importante citocina pleiotrópica pró-inflamatória mediadora do processo inflamatório agudo e crônico, presente nos estágios iniciais de desenvolvimento da doença articular degenerativa, produzida principalmente por macrófagos (VASSALLI, 1992). Possui várias funções biológicas como a indução da secreção de collagenase, prostaglandina E2 e interleucinas, tais como IL-6 e IL-8. (CUNHA et al., 1992; KANEYAMA et al., 2002). O efeito hiperalgésico do TNF- $\alpha$  em doenças articulares tem sido demonstrado em modelos experimentais e em estudos clínicos (VALE et al., 2006). Além disso, essa citocina estimula a proliferação de sinoviócitos, induzindo a hiperplasia sinovial e a formação do pannus (FELDMAN; MAINI, 2003; KIM et al., 2012) .

TNF- $\alpha$  também estimula outra via biológica dependente da liberação das quimiocinas CINC-1/CXCL1 (em ratos, experimentalmente) ou IL-8/CXCL8 (em humanos), as quais são responsáveis pela ativação do componente simpático da hiperalgisia inflamatória, ou seja, promovem a liberação de aminas simpáticas (KANEYAMA et al., 2004; KEVILJ et al., 2007). Tem sido relatado que a IL-8 é induzida por IL-1B e TNF- $\alpha$ . IL-8 ativa

neutrófilos e também estimula as reações inflamatórias que conduzem à destruição de cartilagem (KOSTRZEWA-JANICKA et al., 2012; VERBURGH et al., 1993). Em pacientes com DTM, foram encontrados níveis elevados de IL-8 no fluido sinovial (KANEYAMA et al., 2002).

A família da citocina interleucina-1 consiste em três polipeptídeos: IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e antagonistas do receptor de IL-1 (IL-1ra) (DINARELLO, 1996). A IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  são citocinas pleiotrópicas, possuindo um amplo espectro de atividades imunológicas e inflamatórias. Suas atividades biológicas são semelhantes ao do TNF- $\alpha$ . Pode ser produzida por macrófagos da membrana sinovial, como também por condrócitos ou fibroblastos a partir de cartilagem articular. Estudos sugerem que IL-1 $\beta$  sensibiliza nociceptores e causa hiperalgesia, devendo atuar na fisiopatologia da dor articular advinda da ATM em pacientes com DTM (KOSTRZEWA-JANICKA et al., 2012; KEVILJ et al., 2007; ALSTERGREN et al., 2003). Além disso, IL-1 também contribui para a patogênese da artrite, aumentando a expressão de outras citocinas catabólicas, induzindo a apoptose de condrócitos, via superprodução de óxido nítrico, estimula a produção de prostaglandina E<sub>2</sub>, e moléculas de adesão (KIM et al., 2012; GE et al., 2009; JACQUES, et al., 2006).

IL-6 é uma citocina multifuncional com um papel central na defesa e pode ser produzida por diversos tipos de células, tais como monócitos/macrófagos, células T, fibroblastos e células endoteliais (KIM et al., 2012). IL-6 desempenha um papel importante no aumento da proliferação dos linfócitos T, a diferenciação dos linfócitos B e na ativação da cascata do complemento (KUMAR et al., 2010). Está envolvida no desenvolvimento da sinovite, da destruição óssea e cartilaginosa e da hiperalgesia nos tecidos articulares. Adicionalmente, esta citocina também atua sinergicamente com a IL-1 $\beta$ , induzindo reabsorção óssea. A IL-6 pode ser utilizada como marcador bioquímico de DTM crônicas (KANEYAMA et al., 2004; KOSTRZEWA-JANICKA et al., 2012).

O papel da cascata de citocinas na liberação de prostaglandinas e mediadores amina simpático foi confirmado em ratos (CUNHA et al., 2005) e em camundongos (CUNHA et al., 2010). A prostaglandina (PGE<sub>2</sub>) é um mediador inflamatório de marcante atuação na artrite, e provavelmente a enzima COX-2 é a principal responsável pelo seu aumento local durante o processo inflamatório de tecidos sinoviais devido à produção e atuação no controle de síntese dos ecosanoides. A PGE<sub>2</sub> encontra-se em elevadas concentrações nas articulações inflamadas e podem contribuir para a depleção da matriz extracelular causando erosão na cartilagem e no osso subcondral, vasodilatação, aumento da percepção de dor, desmineralização óssea e promoção da secreção de ativadores de plasminogênio (BORGES

2006; MCINNES & SCHETT, 2011). O uso de inibidores seletivos da COX-2 reduz a inflamação e a dor na ATM de ratos (KERINS et al., 2004).

Serotonina ou 5-hidroxitriptamina (5-HT) é um importante mediador inflamatório encontrado em níveis elevados no líquido sinovial da ATM de pacientes com dor inflamatória (OLIVEIRA-FUSARO et al., 2012). É uma amina derivada do aminoácido triptofano, encontrada no SNC e em todos os tecidos periféricos, armazenada em mastócitos e plaquetas, liberada por estímulos como substância P e neuropeptídeo Y. Em estudos realizados por Alstergren et al., (1999) foi observado o aumento de 5-HT no líquido sinovial de articulações acometidas por processo inflamatório e com sintomatologia dolorosa. Além disso, a injeção na região da ATM de um antagonista do receptor 5-HT<sub>3</sub> reduz a dor da ATM em pacientes com doenças inflamatórias sistêmicas (VOOG et al., 2004). 5-HT induz nocicepção na região da ATM pela ativação de adrenérgicos  $\beta_1$ -e  $\beta_2$  localizados na região da ATM e pela liberação local de aminas simpáticas e prostaglandinas, que podem sensibilizar e / ou ativar os neurônios aferentes primários (OLIVEIRA-FUSARO et al., 2012).

A heme oxigenase (HO) é uma enzima microsomal que catalisa a degradação do grupo heme em monóxido de carbono (CO), biliverdina (BVD) e ferro (ABRAHAM & KAPPAS, 2008). A indução da via da HO fornece um *feedback* negativo para a ativação das células e produção de mediadores inflamatórios, modulando, pelo menos em parte, o processo inflamatório. O grupo heme em sua forma livre é potencialmente tóxico para a célula, por estimular a produção de radicais livres, aumento da permeabilidade vascular, a expressão de moléculas de adesão e a infiltração de neutrófilos para o sítio inflamatório, HO exerce sua ação citoprotetora degradando-o e gerando seus produtos finais (ALCARAZ et al., 2003; SOARES & BACH, 2009).

Até o momento, foram identificadas três isoformas da HO (HO-1, HO-2 e HO-3) (MCCOUBREY et al., 1997). HO-1, a forma induzida da HO, é geralmente expressa em condições de estresse oxidativo, isquemia e reperfusão e é estimulada por citocinas pró-inflamatórias, NO, endotoxinas e heme, o seu substrato, representando um mecanismo de defesa celular que pode modular a resposta inflamatória (YACHIE et al., 2003). A ativação de HO-1 resulta em redução do dano oxidativo e apoptose, reduzindo eventos inflamatórios como edema, migração celular e produção de citocinas pró-inflamatórias. Os produtos da sua ativação, monóxido de carbono (CO), biliverdina (BVD) e ferro, estão envolvidos nessa mediação (ALCARAZ et al., 2003). HO-2 e HO-3 são as formas constitutivas expressas na maioria dos tecidos (MCCOUBREY et al., 1992; MCCOUBREY et al., 1997).

A participação da via HO-1/BVD/CO tem sido demonstrada tanto na artrite em humanos quanto em modelos experimentais de artrite induzida. Em um estudo realizado com cultura de osteoblastos e condrócitos estimulados por IL-1 $\beta$ , obtidos de pacientes com osteoartrite em joelhos, mostrou que a indução de HO-1 reduz a expressão de MMPs, a produção de citocinas pro-inflamatórias como TNF $\alpha$  e IL-6, assim como de PGE<sub>2</sub>, nitrito, TGF $\beta$ 2 (fator transformador de crescimento), TGF $\beta$ 3, e a atividade das enzimas NOSi, COX-2 e mPGES-1 (microsomal prostaglandina E sintase-1) (GUILLÉN et al., 2008; MEGIAS et al., 2009). Em estudos sobre a hipernocicepção inflamatória na ATM induzida por zymosan, foi observado que a via da HO-1 ao ser estimulada foi capaz de reduzir a dor facial, o influxo leucocitário e a atividade da enzima mieloperoxidase, assim como todos os parâmetros histológicos (Chaves, 2012).

Outro importante mediador da resposta imune-inflamatória é o óxido nítrico (NO), envolvido em vários processos fisiológicos, que desempenha um papel complexo e diversificado na modulação da dor e inflamação (CURY et al., 2011). O NO é produzido pelas células residentes articulares sinoviócitos e condrócitos, assim como, por osteoblastos e osteoclastos, e também por células inflamatórias presentes durante patologias, de forma constitutiva ou induzida por mediadores como IL-1 e TNF- $\alpha$  (MCINNES et al., 1996; EVANS & RALSTON, 1996).

O óxido nítrico é um radical livre gasoso que na presença de oxigênio, é rapidamente metabolizado a nitrato e nitrito (STAMLER et al., 1992). A síntese do NO resulta da oxidação de um dos nitrogênios guanidino da L-arginina que é convertida em L-citrulina, esta reação é catalisada pela enzima NO-sintase (NOS) (DUSSE et al., 2003; KUMAR et al., 2010). As isoformas da NOS são agrupadas em duas categorias, NOS endotelial (NOS1) e neuronal (NOS3), ambas expressas constitutivamente (c-NOS), e a NOS induzível (i-NOS) produzida por macrófagos e outras células ativadas por citocina (FUKUTO & CHAUDHURI, 1995; KOBAYASHI, 2010).

O NO também apresenta um papel duplo na regulação dos processos de dor e inflamação, ou seja, ele pode mediar nocicepção e inflamação ou induzir um efeito analgésico e anti-inflamatório. Este efeito duplo ocorre tanto a nível central como periférico. Diante do exposto, muitos estudos vêm sendo realizados, a fim de entender seu efeito duplo. Além disso, Rocha et al. (2002) demonstraram que o NO endógeno é um mediador importante envolvido no desenvolvimento da artrite induzida por zymosan. No entanto, a administração de NO exógeno pode ocasionar a inibição da nocicepção (CURY et al., 2011).

Em estudos relacionados à patogênese da artrite reumatoide foi observado que a produção do NO promove ações pró-inflamatórias como aumento da vasodilatação e permeabilidade celular, potencializando a produção de TNF- $\alpha$  e IL-1 pelos leucócitos e estimulando a atividade angiogênica pelos monócitos e macrófagos (LANDER et al., 1993). O NO produzido por estimulação de citocinas, em pacientes com artrite reumatoide, exerce efeitos nos condrócitos e células sinoviais com subsequente degradação articular (ABRAMSON et al., 2001). Contrariamente, a produção do NO também possui ação anti-inflamatória, inibindo a adesão plaquetária e neutrofilica, causando a redução da migração leucocitária ao sítio inflamatório (THOMASSEN & KAVURU, 2001).

### **1.5 Artrite Induzida por Zymosan**

Estudos em modelos experimentais de dor orofacial utilizando animais através da indução por agentes pró-inflamatórios descrevem um aumento na frequência de comportamentos induzidos como hiperalgesia e alodinia, correlacionando-os com eventos neurais em tecidos periféricos e no SNC (REN & DUBNER, 1999; SVENSSON, 2003).

A artrite induzida por zymosan (Zy) é um modelo de baixo custo operacional, tem início definido e permite a reprodução da lesão em curto prazo podendo, portanto, ser utilizado em protocolos experimentais considerados rápidos (RAMOS, 2000).

Zy é um polissacarídeo derivado da parede celular do fungo *Saccharomyces cerevisiae*, sendo seu principal componente estrutural a  $\beta$ -glucana que apresenta propriedades imunoestimulatórias, capazes de ativar macrófagos e outras células mononucleares (DERBOCIO et al., 2005). Quando injetado intradérmica (RIDGER et al., 1997), intraperitoneal (AJUEBOR et al., 1998) ou intra-articularmente (ROCHA et al., 1999) causa uma resposta inflamatória intensa.

Inicialmente, a inflamação associada ao Zy foi atribuída à ativação da via alternativa do complemento, provocando a geração da anafilatoxina C5a, com subsequente ativação de monócitos e acúmulo de neutrófilos. O Zy é reconhecido pelo receptor delectina 1 que é expresso em monócitos, macrófagos, neutrófilos e células dendríticas. Após o reconhecimento, estimula a produção das citocinas inflamatórias. O Zy também é capaz de induzir a degranulação de mastócitos liberando aminas vasoativas como serotonina e histamina, além de gerar produtos do metabolismo do ácido araquidônico (WILLMENT, 2003; COATES & MCCOLL, 2001; VALE et al., 2006). Além de produzir reação

inflamatória intensa, caracterizada por extensa sinovite, a artrite induzida por Zy também produz hipernocicepção (ROCHA et al., 1999).

A injeção de Zy na cavidade articular de joelho provoca aumento da permeabilidade vascular levando a edema local e ainda, acentuado influxo celular com predomínio de polimorfonucleares (PMNs), sendo a quantidade de células presentes no líquido sinovial máxima na sexta hora após a indução (ROCHA et al., 2003). Posteriormente, desenvolve-se sinovite com infiltrado mononuclear e reação fibroblástica semelhante a uma sinovite crônica que caracteriza o *pannus* reumatoide (KEYSTONE et al., 1977). Em outros estudos foi sugerido a ocorrência da degradação da cartilagem articular e do osso subcondral na fase crônica da artrite induzida por zymozan (GEGOUT et al., 1995; BEZERRA et al., 2004).

O modelo experimental de artrite na ATM de ratos foi estabelecido por Chaves et al. (2011). Os autores investigaram os eventos vasculares e celulares, além do envolvimento do NO na fisiopatologia da artrite induzida por Zy na ATM de ratos, sendo este estudo, o primeiro a ser realizado com o agente inflamatório Zy. Os resultados obtidos apresentaram uma hipernocicepção mecânica induzida por Zy com uma redução significativa do limiar mecânico durante a 4<sup>a</sup> e 6<sup>a</sup> h. Além disso, Zy aumentou o influxo de leucócitos, acompanhado da permeabilidade vascular, aumento da atividade da MPO e da formação de nitrito/nitrato no fluido da ATM na 6<sup>a</sup> h após a indução da artrite. Análise imuno-histoquímica para NOSi mostrou um aumento na expressão dessa enzima em células do disco articular, sinoviais e condrócitos da cartilagem articular.

## **1.6 Fármacos Utilizados nas Disfunções Temporomandibulares**

Embora a etiologia da dor e disfunção temporomandibular seja multifatorial, o tratamento inicial tem como objetivo o emprego de métodos conservadores para aliviar a dor, reduzir o processo inflamatório, quando presente, evitar ou diminuir os danos nas articulações, prevenir manifestações extra-articulares e melhorar a função e o bem-estar do paciente (HERSH et al., 2008; CARRARA; CONTI; BARBOSA, 2010).

O tratamento com medicamentos é recomendado para aliviar o desconforto, controlar o processo inflamatório e possibilitar a realização de procedimentos odontológicos, em casos de dor e limitação funcional, sendo importante verificar os benefícios dos medicamentos e suas contraindicações (BARRETO; BARBOSA; FRIZZO, 2010).

Apesar do curso extremamente incapacitante das DTM, nenhuma das intervenções terapêuticas disponíveis na atualidade é curativa, limitando-se, portanto, a aliviar os sinais e sintomas da doença. Cairns (2010) relata que intervenções farmacológicas no controle de dores orofaciais crônicas normalmente são consideradas terapias adjuntas a tratamentos definitivos, não trazendo necessariamente a cura ou solução do processo patológico.

O tratamento farmacológico utilizado para aliviar as dores persistentes relacionadas à DTM é igual aos tratamentos de outras condições de dores crônicas. Os principais grupos de fármacos mais utilizados nos distúrbios inflamatórios são os anti-inflamatórios não-estereoidais (AINEs), analgésicos opioides e os glicocorticoides. Podem ser usados também: ansiolíticos, relaxantes musculares, antidepressores, anticonvulsivantes, benzodiazepínicos e anestésicos locais (GREMEAUX et al., 2013; HERSH et al., 2008).

Os AINEs constituem a classe de fármacos mais prescritos e utilizados no mundo, são os medicamentos de escolha para o controle da dor aguda e inflamatória na maioria das DTM, são particularmente indicados nos casos de artralguas, artrite e dores musculares (HERSH et al., 2008; GREMEAUX et al., 2013). Sua atividade anti-inflamatória ocorre, principalmente, pela inibição da síntese de prostaglandinas, efetuada mediante a inativação das ciclo-oxigenases constitutiva (COX-1) e induzível (COX-2). A primeira é responsável pelos efeitos fisiológicos das prostaglandinas em sítios gástricos e renais. A enzima COX-2 é a isoforma induzida localmente na presença de dano tecidual por estímulos inflamatórios e citocinas. (AMARO et al., 2009; SOLTRES et al., 2010; KIM et al., 2013). Esses fármacos apresentam também atividades analgésica e antipirética. Diclofenaco é um tipo de AINE que possui tanto efeito analgésico como anti-inflamatório (MEJERSJÖ & WENNEBERG, 2008).

Os efeitos adversos relacionados à toxicidade gastrointestinal e renal são as queixas mais comuns de pacientes que utilizam AINEs convencionais, e representam risco de vida para pacientes que fazem uso crônico desses medicamentos (AYGÜN et al., 2012). As queixas variam muito em severidade, e incluem náuseas, dispepsia e ulceração. Esses efeitos estão associados com a inibição da COX-1, responsável por formar prostaglandinas homeostáticas (PG<sub>2</sub> e PGI<sub>2</sub>), consideradas protetoras da mucosa gástrica e também presentes nos rins (SOTRES et al 2010; MEJERSJÖ & WENNEBERG, 2008). Na tentativa de preservar as características anti-inflamatórias, reduzindo os efeitos adversos, as pesquisas tem sido direcionadas para a busca por inibidores seletivos para COX-2 (TUCHS & WANNMACHER, 1998). Entretanto, os inibidores seletivos da COX-2 também diminuem a produção de PGI<sub>2</sub> vascular (ação de vasodilatação e antiagregante) e podem afetar o equilíbrio entre eicosanoides protrombóticos e antitrombóticos, afetando o equilíbrio em favor de

eicosanoides protrombóticos (tromboxano A<sub>2</sub>) podendo levar a eventos trombóticos cardiovasculares (HERSH et al., 2008; GUNSON et al., 2012).

Entre as classes de AINEs, meloxicam e nimesulida são considerados inibidores preferenciais da COX-2, sendo a nimesulida muito utilizada no tratamento de osteoartrite (LEES et al., 2004). Com relação à indometacina, derivada do ácido indolacético, faz parte dos AINEs não seletivos para COX-2, sendo considerado um dos fármacos mais importantes usados nas pesquisas laboratoriais com animais nos modelos de nocicepção e inflamação. Esse fármaco apresenta propriedades anti-inflamatória, analgésicas e antipiréticas e seu mecanismo de ação abrange a inibição da síntese de todas as PGs, por bloqueio reversível da via mediada pelas ciclo-oxigenases (RAFFIN et al., 2003; SCHOLZ et al., 2012). Estudos recentes mostram que a indometacina tem o potencial de ativar seletivamente a proteína quinase C (PKC-ε) através da ligação direta, independentemente da inibição da COX (KANNO et al., 2012).

Outros fármacos também são utilizados no controle da dor, dentre eles destacam-se os opioides, os anestésicos e várias substâncias não opioides (BENYHE, 1994). O termo opioide aplica-se a qualquer substância que produz efeitos semelhantes aos da morfina e que são bloqueados por antagonistas do tipo naloxona (REISINE et al., 1996). O entendimento mais recente dos mecanismos de ação dos opiáceos, sejam eles naturais ou sintéticos, foi enormemente impulsionado pelo desenvolvimento de moléculas sintéticas capazes de antagonizar seu efeito (GOODMAN et al., 2005).

Os analgésicos opioides são substâncias com efeito analgésico atuando potencialmente no SNC, alterando a percepção do indivíduo, levando à diminuição da dor. Opiáceos, como a morfina, representam atualmente a melhor opção para o controle da dor moderada a grave em trauma induzidos, pós-operatório e na dor oncológica. O uso de opioides na dor crônica não oncológica permanece controverso, pois a morfina ocasiona alguns efeitos indesejáveis, como: euforia, náuseas, vômitos, depressão respiratória, dependência física e psicológica, redução da motilidade gastrointestinal e espasmo do músculo liso, levando a constipação e algumas vezes espasmo biliar e uretral (SILVA; SAKATA; ISSY, 2004). A administração prolongada de opioides pode desenvolver no indivíduo uma tolerância antinociceptiva, na qual altas doses do fármaco são necessárias ao longo do tempo para obter a mesma resposta analgésica, além de dependência quando usada por um período prolongado (WHITE & WILSON, 2010). Esses efeitos colaterais fazem dos opioides uma fraca escolha nos tratamentos de DTM (DENUCCI; DIONNE; DUBNER; 1996; O'NEIL et al., 2012).

A naloxona antagoniza as ações analgésicas, assim como outros efeitos da morfina tais como a depressão respiratória. Além disso, bloqueia a ação dos fármacos semelhantes à morfina e tem sido amplamente usada como padrão para determinar se a analgesia é mediada por um mecanismo opioide, particularmente na transmissão da dor. A naloxona foi o primeiro antagonista puro de opioides, tendo afinidade por todos os três receptores de opioides: Mu ( $\mu$ ), Delta ( $\delta$ ) e Kappa ( $\kappa$ ) (PICOLO, GIORGI, CURY, 2000; MADENOGLU et al., 2010).

Antes de prescrever um analgésico opioide, deve ser determinado o nível de dor e a sua interferência na qualidade de vida do paciente. O uso de opiáceos para as DTM deve ser recomendado apenas para pacientes que tenham comprovado alguma disfunção intratável ou em procedimentos cirúrgicos ou implantes que tenham sido realizados sem sucesso. Em procedimentos operatórios ou no tratamento de distúrbios intracapsular, a morfina tem sido administrada intra-articularmente. Alguns relatos sugerem a existência de receptores periféricos opiáceos nos tecidos da ATM, o que pode explicar os benefícios deste tratamento (HERSH et al., 2008).

Os glicocorticoides são agentes anti-inflamatórios potentes indicados como coadjuvantes no tratamento de dores agudas e crônicas, amplamente utilizados na DTM, podem ser administrado oralmente ou injetados diretamente na articulação (ZAMAN et al., 2013; HERSH et al., 2008), essas propriedades devem-se principalmente à inibição do gene da COX-2 e a indução da proteína lipocortina, que inibe a enzima fosfolipase A<sub>2</sub>. Além disso, reduzem a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ), modulam o fator de transcrição NF- $\kappa$ B e também desencadeiam a apoptose em diversos tipos de células (ZAMAN et al., 2014; SATO et al., 2010). A dexametasona é um potente glicocorticoide sintético largamente utilizado, possui propriedades imunossupressora e anti-inflamatória (RHODUS, 2006).

Como a disfunção temporomandibular é um problema de saúde pública e de dimensão mundial, faz-se necessário o desenvolvimento de analgésicos e anti-inflamatórios que possuam vantagens em relação aos existentes na farmacoterapia atual. Portanto, a busca por novos compostos mais efetivos e com baixa toxicidade, possuindo efeitos adversos mínimos é de extrema importância e vem sendo alvo de muitas pesquisas. Nesse sentido, as algas marinhas vêm se destacando, pois são fontes de produtos naturais, como as lectinas, que possuem capacidade anti-inflamatória, antinociceptiva e imunoestimulatória representando assim, uma fonte potencial na produção de novos fármacos (VANDERLEI et al. 2010; ABREU et al., 2012).

## 1.7 Algas Marinhas

O termo “Algas” não tem legitimidade taxonômica formal, é rotineiramente usado para indicar um grupo polifilético, incluindo os organismos que não compartilham uma origem comum, mas seguem linhas evolutivas múltiplas e independentes, possuindo representantes nos Domínios Eubacteria e Eukarya. Além disso, sendo produtores primários, as algas tem semelhantes funções biológicas e ecológicas com as plantas, mas não compartilham uma história evolutiva comum e sua bioquímica difere significativamente em relação aos pigmentos acessórios, polissacarídeos de reserva, glicoproteínas e compostos fenólicos (BARSANTI & GUALTIERI, 2006; STENGEL; CONNAN; POPPER, 2011).

As algas marinhas são responsáveis por uma boa parte da atividade fotossintética no mundo, representam a base da cadeia alimentar e estão dispostas em onze Divisões, segundo critérios químicos, citológicas e morfológicas. Podem ser encontrados em ambientes aquáticos e terrestre úmidos, variam bastante no tamanho, podendo apresentar de 3-10  $\mu\text{m}$ , como as algas unicelulares (microalgas), até mais de 70 m de comprimento, como as gigantes *kelps* (macroalgas), e encontram-se distribuídas em diferentes habitats, tais como oceanos, corpos de água doce, solos, rochas e superfície de vegetais (EL GAMAL, 2010; CARVALHO & ROQUE, 2000).

A classificação botânica das macroalgas marinhas é dada de acordo com a estrutura física, função e ciclo reprodutivo em: Chlorophyta (algas verdes), principalmente pela predominância das clorofilas a e b; Phaeophyta (algas pardas), principalmente pela presença dos pigmentos xantofila e fucoxantina e Rhodophyta (algas vermelhas), devido à predominância dos pigmentos ficoeritrina e ficocianina (EL GAMAL, 2010). Diante das constantes mudanças no ambiente marinho, grupos de algas mais adaptados foram selecionados, por meio de uma variedade de estratégias de sobrevivência, as quais influenciam enormemente a sua morfologia, fisiologia e bioquímica (VIDOTTI & ROLLEMBERG, 2004).

A diversidade bioquímica das algas marinhas faz com que esses organismos representem uma valiosa fonte de novos compostos químicos, os quais têm revelado importantes resultados nas mais variadas aplicações industriais, biotecnológicas e farmacêuticas (WIJESINGHE & JEON, 2011). Dentre estes compostos, podemos destacar as lectinas.

### 1.7.1 Lectinas

A origem da palavra lectina é proveniente do latim, “legere” que significa selecionar ou escolher e foi utilizado para definir uma classe de aglutininas de plantas superiores (BOYD et al., 1954). Muitas definições foram dadas ao longo dos anos, na tentativa de melhor conceituá-las. No entanto, a definição mais aceita na comunidade científica foi proposta por Peumans & Van Damme (1995), na qual lectinas são proteínas ou glicoproteínas de origem não imune contendo pelo menos um domínio não catalítico que se liga reversivelmente a mono ou oligossacarídeos específicos. Essa ligação a resíduos de carboidratos pode ser de alta especificidade, mas não altera a estrutura química dos ligantes. As lectinas possuem ampla distribuição na natureza e já foram encontradas em bactérias, fungos, algas, plantas superiores, vertebrados, invertebrados e vírus (LIS & SHARON, 1981; RÜDIGER & GABIUS, 2001).

As lectinas são proteínas que apresentam grande variedade em tamanho, estrutura e organização molecular, possuindo, em comum, a capacidade de reconhecer e interagir com sítios contendo glicoconjugados. Devido a essa capacidade de interação a carboidratos, as lectinas podem se ligar a certos componentes da membrana das células sanguíneas, ocasionando aglutinação, constituindo o principal atributo para sua detecção, purificação e caracterização (LIS & SHARON, 1998).

De acordo com suas características estruturais, as lectinas são subdivididas em quatro grupos (**Figura 4**): merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas (PEUMANS & VAN DAMME, 1998).

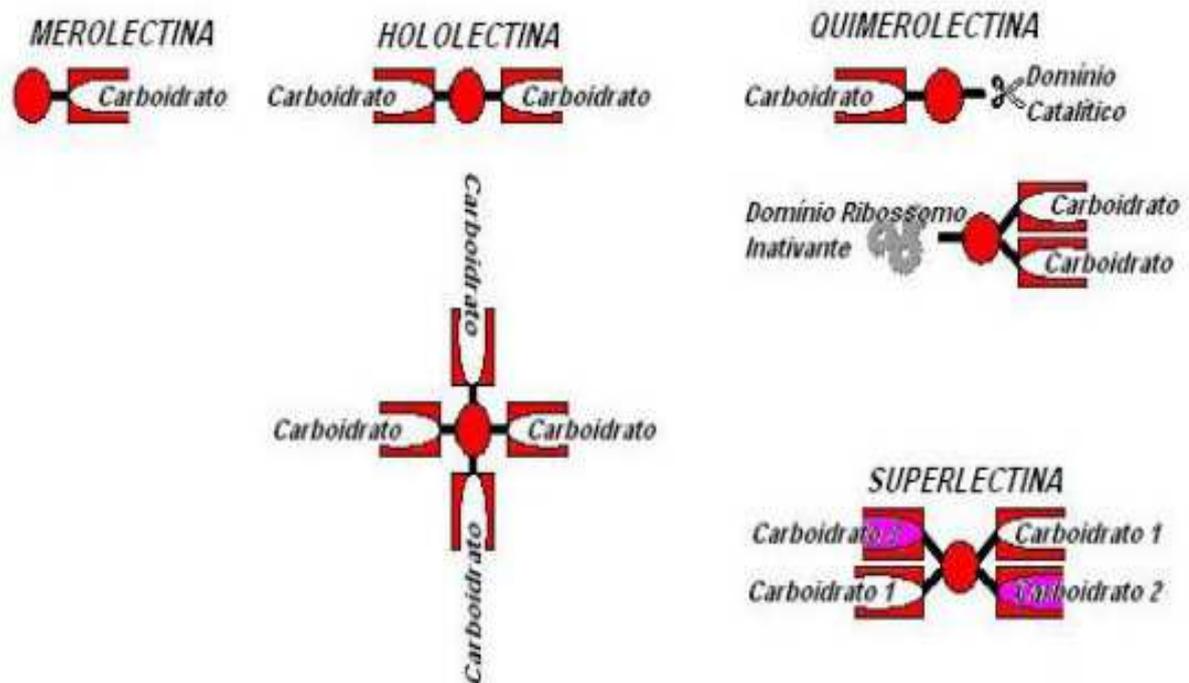
As merolectinas são proteínas de baixo peso molecular e possuem apenas um sítio de ligação a carboidratos, logo, apresentam um único domínio lectínico e, por conta disso não são capazes de aglutinar células ou precipitar glicoconjugados (PARIJS et al., 1991). As hololectinas apresentam dois ou mais domínios idênticos ou bastante homólogos, que se ligam ao mesmo carboidrato ou a açúcares de estrutura similar e, portanto, são capazes de promover a aglutinação de células e/ou precipitar glicoconjugados. A maioria das lectinas conhecidas como hemaglutininas pertencem a esse grupo (CAVADA et al., 2001).

As quimerolectinas são lectinas que possuem um ou mais domínios ligantes a carboidratos e um domínio não relacionado, que pode apresentar atividade catalítica ou qualquer outra atividade biológica, atuando independentemente dos domínios ligantes a carboidratos. Por fim, as superlectinas são lectinas de natureza quimérica que consistem de,

no mínimo, dois domínios ligantes a carboidratos, os quais são estruturalmente distintos e reconhecem carboidratos diferentes (PEUMANS & VAN DAMME, 1998).

As estratégias utilizadas por essas moléculas para gerar sua especificidade por carboidratos incluem a formação de pontes de hidrogênio com moléculas de água, modificações pós-traducionais e oligomerizações (VIJAYAN; CHANDRA, 1999). Devido ao seu potencial de interações proteína-carboidrato as lectinas são ferramentas valiosas em diversos processos biológicos como, interações patógeno-hospedeiro, reconhecimento celular, comunicação célula-célula, indução de apoptose, metástases e diferenciação celular (ZIÓŁKOWSKA; WLODAWER, 2006).

**Figura 4- Classificação Estrutural das Lectinas**



Fonte: VAN DAMME et al. (1998).

### 1.7.1.1 Lectinas de Algas Marinhas

Até o momento, existem menos de 100 publicações que descrevem a presença de lectinas em algas marinhas vermelhas, verdes e pardas. O primeiro relato de atividade hemaglutinante nestes organismos foi realizado por BOYD et al. (1966). Depois disso, outros estudos que descrevem a presença e / ou purificação de lectinas de algas foram relatados por grupos da Inglaterra (BLUNDEN et al., 1975), Japão (KAMIYA et al., 1982), Espanha (FABREGAS et al., 1984), Estados Unidos (CHILES et al., 1989) e Brasil (AINOUZ et al., 1991). As algas vermelhas são as mais estudadas, seguidas pelas algas verdes e pardas (EL GAMAL, 2010).

Ainouz & Sampaio (1991) foram pioneiros no estudo de lectinas de algas marinhas no Brasil. Ao estudar a ocorrência de lectinas de alga marinhas no nordeste brasileiro, verificaram que os extratos salinos de dez espécies aglutinaram eritrócitos de coelho, enquanto sete aglutinaram eritrócitos de galinha, seis de boi e quatro de carneiro.

Rogers et al. (1997), analisaram 96 novas espécies de algas e constataram que o tratamento dos eritrócitos com enzimas proteolíticas facilitavam a detecção de lectinas de algas marinhas. O uso de enzimas proteolíticas possibilita uma aglutinação mais forte provavelmente, devido a uma combinação de fatores como a remoção de sialoglicoproteínas e suas cargas negativas da superfície dos eritrócitos; redução no impedimento estérico causado por polipeptídeos dos eritrócitos e aparecimento de carboidratos e glicoproteínas anteriormente não acessíveis na superfície dessas células (LIS & SHARON, 1986)

No geral, as lectinas de algas apresentam baixo peso molecular, nenhuma afinidade para monossacarídeos, forte especificidade para oligossacarídeos e/ou glicoproteínas complexas e, geralmente, não requerem cátions divalentes para a sua atividade biológica (ROGERS & HORI, 1993; AINOZ et al., 1995). Além disso, ocorrem principalmente na forma monomérica, têm uma alta proporção de aminoácidos ácidos e apresentam pontos isoelétricos (pI) entre 4 e 6 (HORI; MIYAZAWA; ITO, 1990).

É sabido que, nos vegetais superiores, as lectinas estão envolvidas na defesa contra bactérias e fungos patogênicos, através do reconhecimento e imobilização de microorganismos via ligação, prevenindo o seu crescimento e multiplicação (LIAO *et al.*, 2003). Porém, até o presente, pouco se sabe sobre o envolvimento das lectinas nas funções fisiológicas das algas.

Os métodos clássicos utilizados para isolar lectinas de algas marinhas incluem métodos de extração das proteínas solúveis em soluções salinas tamponantes. O extrato total

obtido pode ser submetido a precipitações salinas (salting out), principalmente com sulfato de amônio, a procedimentos cromatográficos (sequenciais ou não) e depois a eletroforese. Dentre os procedimentos cromatográficos estão as cromatografias gasosas, de troca iônica, de interação hidrofóbica, de filtração em gel e de afinidade (HARNEDY & FITZGERALD, 2011). No processo de purificação de lectinas de algas a cromatografia de troca iônica é muito eficiente na separação e na eliminação de pigmentos, principalmente nas fases iniciais das etapas de purificação. O procedimento cromatográfico de troca iônica tem sido utilizado de forma isolada ou em combinação com outros procedimentos cromatográficos (COSTA et al., 1999).

Até o momento, cerca de 32 lectinas de Rhodophyceae e 17 lectinas de Chlorophyceae foram isoladas e caracterizadas. A primeira lectina a ser purificada e caracterizada parcialmente foi a espécie de alga marinha vermelha *Ptilota plumosa* (ROGERS; BLUNDEN; EVANS, 1977). A lectina da alga marinha *Hypnea cervicornis* foi obtida através cromatografia de troca iônica em gel de DEAE-Sephacel (NAGANO et al., 2005). Rogers & Hori (1993), purificaram a lectina da alga marinha vermelha *P. serrata* pela combinação de processos cromatográficos de troca iônica em gel de DEAE-Sephacel e exclusão molecular em Bio Gel P-100. Enquanto, a lectina da alga marinha *Gracilaria ornata* foi isolada através de cromatografias sequenciais de troca iônica em DEAE-celulose e afinidade em coluna de mucina-sepharose 4B (LEITE et al., 2005).

Oliveira et al. (2002) isolou a lectina presente na alga marinha vermelha *Pterocladia capilacea* utilizando procedimento cromatográfico de afinidade em gel de goma de guar. Costa et al. (1999) utilizaram a manana de levedura em procedimentos cromatográficos de afinidade para o isolamento da lectina presente na alga marinha vermelha *A. multifida*.

#### 1.7.1.2 Atividades Biológicas das Lectinas de Algas Marinhas

Devido, principalmente, à capacidade de interagir com carboidratos ou com substâncias que os contêm, as pesquisas com lectinas vêm crescendo no mundo inteiro, propiciando um imenso campo de aplicação biológica em diversas áreas, como na agricultura, na bioquímica e nas ciências biomédicas. Segundo Rogers & Hori (1993), as lectinas de algas marinhas seriam mais apropriadas para o uso como ferramentas biológicas, pois possuem uma massa molecular menor quando comparadas com as lectinas de plantas, dessa forma apresentariam uma reação antigênica menor.

Diante disso, as lectinas de algas marinhas podem ser usadas com eficiência para estimular e/ou inibir divisão celular (HORI et al., 1988; HARNEDY; FITZGERALD, 2011), reconhecer células leucêmicas e tumorais (HAYASHI et al., 2012), induzir a apoptose celular de células humanas cancerosas e derivadas de camundongos BALB/ c (OMOKAWA et al., 2010), estimular e/ou inibir o crescimento de microrganismos (HOLANDA et al., 2005), combater vírus (SATO et al., 2011), dentre outros.

Com relação ao estudo de inflamação, algumas lectinas de algas apresentaram efeitos pró-inflamatórios, induzindo a migração de neutrófilos em ratos e camundongos (NEVES et al., 2001). Enquanto outras como as lectinas das algas marinhas vermelhas *Pterocladia capillacea*, *Hypnea cervicornis* e *Solieria filiformis* e a lectina da alga marinha verde *C. cupressoides* apresentaram tanto efeito anti-inflamatório como antinociceptivo (SILVA et al., 2010; BITENCOURT et al., 2008; FIGUEIREDO et al., 2010; ABREU, 2012; VANDERLEI et al., 2010). Além disso, Abreu et al. (2012) mostraram que as lectinas das algas *S. filiformis*, *P. capillacea* e *C. cupressoides* têm propriedades imunoestimulatórias sem provocar citotoxicidade, quando em contato com esplenócitos de camundongos BALB/c.

Viana et al. (2002) avaliaram o efeito analgésico das lectinas das algas *Bryothamnion triquetrum* e *Bryothamnion seaforthii* mostrando que elas possuíam efeito nociceptivo periférico e central. Todos os efeitos foram revertidos por naloxona, um antagonista da morfina, sugerindo a participação do sistema opioide na atividade antinociceptiva observada.

#### 1.7.1.3 Lectina da Alga Marinha Verde *Caulerpa cupressoides*

*Caulerpa cupressoides* var. *lycopodium* C. Agardh é uma espécie de alga verde, pertencente à família Caulerpaceae amplamente encontrada ao longo da costa do Nordeste do Brasil. Benevides et al. (2001), isolaram pela primeira vez a lectina desta espécie de alga (LCc), através de cromatografia de afinidade em gel de  $\alpha$ -lactose-agarose, seguida de filtração em gel em Bio Gel P-100. O peso molecular (PM) de LCc, determinado pela cromatografia de filtração em gel foi de 44,700 Da. Nesse mesmo estudo, foi realizado uma eletroforese desnaturante SDS-PAGE, na qual a lectina exibiu uma única banda de proteína com um PM de 23,158 Da, sugerindo que LCc seja uma proteína dimérica.

Vanderlei et al., (2010) purificou a mesma lectina utilizando o procedimento de cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose, seguido de filtração em gel de

Sephadex G-100. Posteriormente Queiroz (2013) obteve a LCc através apenas da cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose.

A análise da composição de aminoácidos da LCc mostrou uma maior presença dos aminoácidos glicina, ácido aspártico, ácido glutâmico, serina e uma baixa presença de aminoácidos básicos (BENEVIDES et al., 2001). Possui na sua sequência NH<sub>2</sub>-terminal 31 resíduos de aminoácidos, apresentando 43% de identidade com a proteína da microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii*. Além disso, os picos de LCc obtidos através de cromatografia Sephadex G-100 e DEAE-celulose mostraram similaridade nos sinais em ambos os espectros obtidos por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (<sup>1</sup>H-RMN) (QUEIROZ, 2013).

Quando submetida ao tratamento térmico LCc foi estável a 70 ° C, durante 60 minutos, e ainda manteve 25% de sua atividade original, mesmo depois de 60 min a 90 ° C. LCc foi inibida pela lactose e alguns dos seus derivados e fortemente inibida pela glicoproteína mucina de estômago porcina (BENEVIDES et al., 2001).

Estudos subsequentes realizados pelo nosso grupo mostraram que LCc apresenta propriedades imunoestimulante, induzindo respostas imunes T helper 2 em esplenócitos de camundongos BALB/c e produzindo níveis elevados de IL - 10 e IL - 6 *in vitro* (ABREU et al., 2012). Além de possuir efeito antinociceptivo e anti-inflamatório em modelos clássicos de nocicepção e inflamação aguda *in vivo* (VANDERLEI et al., 2010; QUEIROZ, 2013).

Nesse sentido, o uso de lectinas de algas marinhas nas ciências biomédicas representa uma valiosa estratégia para compreensão dos mecanismos celulares e moleculares de processos patológicos, contribuindo para a descoberta de novas abordagens terapêuticas que possam interferir e alterar o curso evolutivo de tais processos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Investigar os efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório da lectina da alga marinha verde *Caulerpa cupressoides* no modelo de artrite induzida por zymosan na articulação temporomandibular de ratos.

### 2.2 Específicos

- ✓ Extrair e Purificar da lectina da alga marinha verde *C. cupressoides* (LCc) por cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose;
- ✓ Avaliar os efeitos da LCc na hipernocicepção mecânica no modelo de artrite na ATM induzida por Zy;
- ✓ Avaliar os efeitos da LCc no influxo celular do lavado sinovial da ATM de ratos através da contagem do número de leucócitos totais e da dosagem da atividade de mieloperoxidase;
- ✓ Analisar as alterações inflamatórias agudas dos tecidos da ATM através da análise histológica;
- ✓ Determinar a produção da citocina pró-inflamatória IL-1 $\beta$  no tecido periarticular e gânglio trigeminal de animais com artrite tratados com LCc;
- ✓ Avaliar a imunexpressão de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e HO-1 na ATM de ratos com artrite tratados com LCc;
- ✓ Investigar o envolvimento da via da HO-1 nos mecanismos de ação antinociceptivo e anti-inflamatório da LCc no modelo de artrite induzida por Zy na ATM de ratos;
- ✓ Avaliar a participação dos receptores opiodes periféricos na ação antinociceptiva da LCc no modelo de artrite induzida por Zy na ATM de ratos.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Materiais

##### 3.1.1 Alga Marinha

A alga marinha verde *Caulerpa cupressoides* var. *lycopodium* (**Figura 5**) foi coletada em rochas do meso-litoral, durante maré baixa (-0,2 a 0,2 m) na praia do Pacheco, município de Caucaia-Ceará. Posteriormente, a alga foi acondicionada em sacos plásticos e transportada, em recipientes isotérmicos, para o Laboratório de Carboidratos e Lectinas (CarboLec) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará (UFC). No laboratório, as algas foram lavadas para retirada de epífitas e/ou organismos incrustantes e estocada a -20 °C, para posterior utilização. Um exemplar da espécie foi identificado, e uma exsicata depositada no Herbário Prisco Bezerra sob o número 4977, na UFC.

**Figura 5-** Alga Marinha Verde *Caulerpa cupressoides* var. *lycopodium*. Classificação Taxonômica



Fonte: Renata Line da C. Rivanor.

**Filo:** *Chlorophyta* (alga verde)

**Classe:** *Caulerphyceae*

**Ordem:** *Caulerpales*

**Família:** *Caulerpaceae*

**Gênero:** *Caulerpa* (KAWL-er-puh) M.

(Vahl) C. Agardh, 1817.

**Epíteto específico:** *cupressoides*

**Nome botânico:** *Caulerpa cupressoides* (Vahl) C.

Agardh

Fonte: JOLY, 1965.

##### 3.1.2 Células Sanguíneas

Para a determinação da atividade hemaglutinante, amostras de sangue (3-5 mL) foram obtidas de coelho albino adulto e sadio, mantido no Biotério do Departamento de

Bioquímica e Biologia Molecular da UFC. A coleta de sangue foi realizada na via marginal do pavilhão auricular.

### 3.1.3 Animais

Foram utilizados ratos *Wistar* machos (180-240 g; n=6) fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Ceará, mantidos em sala com a temperatura ambiente controlada (24 °C), em um ciclo claro e escuro (12 h/12 h). Ração padrão e água foram disponibilizadas aos animais *ad libitum*. Todos os esforços foram feitos para minimizar o número e o sofrimento dos animais utilizados. Os ensaios com os animais receberam a aprovação da Comissão de Ética em Pesquisa Animal da UFC (CEPA n° 59/13) e seguiram os padrões exigidos de ética e biossegurança, respeitando o princípio dos 3 Rs da experimentação animal (“reduction, replacement and refinement”).

### 3.1.4 Soluções, Drogas e Reagentes

Todos os reagentes que foram utilizados apresentavam grau de pureza e propriedades analíticas adequadas. As drogas e reagentes que foram utilizadas para a realização deste trabalho foram:

Albumina sérica bovina (BSA), Coomassie Brilliant Blue G-250, tripsina, Tris (Hidroximetil) aminometano (Tris), DEAE-Celulose, mucina (Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A.). Álcool comercial, hematoxilina, eosina, violeta de genciana (Reagen), ácido clorídrico P.A (HCl), ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), hidróxido de sódio (NaOH), ácido fosfórico P.A. (Synth, Brasil), ácido acético P.A, formaldeído P.A, Carbonato de Sódio (MERCK), cloreto de sódio (NaCl), acetato de sódio, peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), D-galactose (Vetec Química farm. LTDA, SP-Brasil); isoflurano, fosfato de potássio dibásico,; o-dianosidina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Tampão carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>); naloxona (Narcen®, Rhodia; São Paulo, SP, Brasil); tribromoetanol; cloridrato de morfina (Dimorf®, Cristália, Itapira, SP, Brasil); anticorpo TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e HO-1(abcam discover more); KIT ABC IgG de cabra (VECTASTAIN); dietil pirocarbonato (DEPC); zinco protoporfirina-IX (ZnPP-IX) (Sigma); zymosan (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) NEED. As drogas e reagentes foram solubilizados em salina estéril (0,9%, NaCl) ou água destilada.

## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Extração e Purificação da Lectina da Alga Marinha Verde *C. cupressoides*

A lectina da alga marinha verde *C. cupressoides* (LCc) foi obtida utilizando a metodologia descrita por Benevides et al. (2001) com modificações realizadas por Vanderlei et al. (2010).

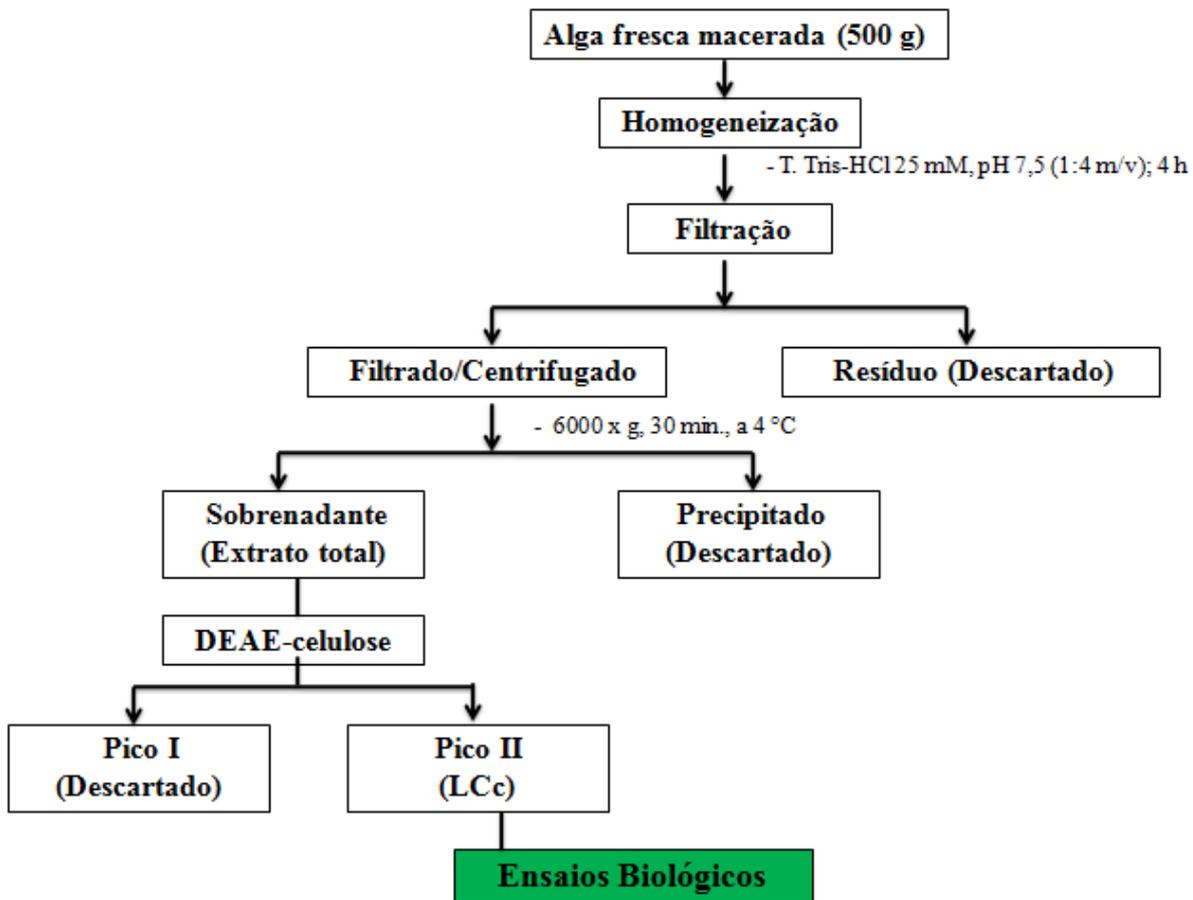
#### 3.2.1.1 Preparação do Extrato Total

Inicialmente, a alga estocada a -20 °C foi parcialmente seca e macerada em nitrogênio líquido. Em seguida, foi colocada em contato com tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5 (TB), na proporção de 1:4 (m/v). Após agitação constante por 4 horas, o homogenato foi filtrado em tecido de nylon e em seguida centrifugado a 6.000 x g por 30 min a 4 °C. O precipitado foi, então, descartado e o sobrenadante, dialisado exaustivamente contra água destilada e liofilizado, sendo denominado extrato total (**Figura 6**).

#### 3.2.1.2 Cromatografia de Troca Iônica em Coluna de DEAE-Celulose

O extrato total obtido foi submetido à cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Celulose, previamente equilibrada com TB. Após a completa eluição da fração não retida na coluna com TB, foi realizada a eluição da fração adsorvida na matriz por adição de NaCl 0,5 M ao tampão de equilíbrio. Durante o procedimento cromatográfico foi mantido um fluxo constante de 3mL/tubo/min, e as medidas de absorbância das frações eluídas foram lidas a 280 nm em espectrofotômetro (Armstrong Biosciences Ultrospec 1100 pro). A atividade hemaglutinante foi determinada contra eritrócitos tripsinizados de coelho. A fração ativa (Pico II) foi reunida, dialisada contra água destilada, liofilizada e denominada de Lectina de *Caulerpa cupressoides* LCc.

Figura 6 – Esquema de Extração e Purificação da Lectina da Alga Marinha Verde *C. cupressoides* (LCc).



### 3.2.2 Determinação da Atividade Hemaglutinante

Os ensaios de atividade hemaglutinante das frações proteicas obtidas por DEAE-celulose foram realizados através de diluições seriadas em tubos de ensaio. Em cada tubo foram adicionados 100  $\mu$ L de NaCl 0,15 M. No primeiro tubo, foram adicionados 100  $\mu$ L da amostra e uma série de diluições duplas foram realizadas (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, etc.), sempre homogeneizando antes de cada transferência. A cada diluição foram adicionados 100  $\mu$ L de uma suspensão de eritrócitos de coelho a 2 % tratados com tripsina, a reação foi incubada à temperatura ambiente por 60 minutos, conforme descrito por Ainouz et al. (1992). Posteriormente, os tubos foram centrifugados (2.000 x g, por 30 s), e os resultados lidos macroscopicamente, sendo o título expresso em unidades de hemaglutinação (UH/mL), que é o inverso da maior diluição da amostra que apresentar nítida aglutinação.

### 3.2.3 Estudo dos efeitos Antinociceptivo e Anti-inflamatório de LCc na Artrite da Articulação Temporomandibular de Ratos induzida por Zymosan

#### 3.2.3.1 Avaliação da Hipernocicepção Mecânica

A hipernocicepção mecânica foi avaliada através do comportamento de retirada da cabeça do animal (head-withdrawal threshold) em resposta à aplicação de uma força (g) de intensidade crescente na região facial corresponde à articulação temporomandibular (ATM). Um dos métodos clássicos utilizados para avaliar a presença de alodínia é através do emprego de filamentos de Von-Frey. Nesse estudo, foi utilizado um equipamento desenvolvido pela Insight (Ribeirão Preto, SP, Brasil), o qual é baseado em um sistema de transdução digital que registra a força máxima aplicada ao animal até o momento de sua resposta de retirada (DENADAI-SOUZA et al., 2009).

Os animais foram treinados para que a aferição da hipernocicepção mecânica fosse possível. Para isso, primeiramente foi realizada tricotomia na região da ATM esquerda de ratos *Wistar*. Durante o treinamento, os animais foram transferidos para gaiolas individuais onde foram mantidos previamente por trinta minutos e condicionados a receber estímulos mecânicos na região facial corresponde à ATM esquerda durante quatro dias antes ao dia de indução da artrite e aferição da nocicepção. No quinto dia, foi obtido o valor basal (média de três medidas) da região facial corresponde à ATM esquerda (DENADAI-SOUZA et al., 2009).

Grupos de animais receberam por via (i.v) e 30 min. antes da indução da artrite, a LCc (0,1; 3 ou 10 mg/kg), salina estéril 0,9 % ou indometacina (5 mg/kg, s.c.). Para a indução da artrite na ATM os animais foram brevemente anestesiados por inalação com Isoflurano e, em seguida, receberam uma injeção intra-articular de zymosan (Zy) (2 mg/ articulação; 40 µL) diluído em salina estéril na ATM esquerda dos animais, utilizando agulha de insulina com calibre de 29 G em seringa de 0,5 mL (CHAVES et al., 2011). O grupo Sham recebeu solução salina estéril 0,9 % no mesmo volume na ATM esquerda. A agulha foi inserida no ponto imediatamente inferior à borda posterior do arco zigomático e avançada em direção medial e anterior até contato com o côndilo. Esse contato foi verificado movimentando a mandíbula, e a punção da agulha no espaço articular foi confirmada pela perda de resistência, quando se injetou o Zy.

A avaliação da importância do domínio lectínico de LCc no possível efeito antinociceptivo e anti-inflamatório, foi realizado através da incubação da LCc (10 mg/kg)

com seu hapteno mucina (100 mg/kg) durante 12 à 37 °C. Após incubação, aplicada por via i.v. nos animais 30 min antes do estímulo. Para descartar um possível efeito da glicoproteína mucina sobre a hipernocicepção e na inflamação, esta também foi aplicada (100 mg/kg) isoladamente 30 min antes da injeção de Zy.

Na 4ª hora, após a indução da artrite, a hipernocicepção mecânica foi registrada através da observação do limiar do reflexo de retirada da cabeça do animal resultante da média de três medidas consecutivas (CHAVES et al., 2011).

### 3.2.3.2 Contagem do Influxo Celular no Lavado Sinovial

Na 6ª hora, após a indução da artrite, os animais foram anestesiados com tribromoetanol (1 mL/100 g; i.p.) e eutanasiados por exsanguinação. Os tecidos superficiais foram dissecados até atingir a ATM para coleta do lavado sinovial. A seguir, as ATMs esquerdas foram lavadas com volumes de 0,05 mL (2 x) de solução com tampão fosfato de potássio (PBS) e EDTA. Dos lavados articulares obtidos, foram retiradas uma alíquota (10 µL) que, após coloração em solução de Turk (90 µL), foi utilizada para contagem total do número de leucócitos utilizando câmara de Neubauer em microscópio óptico com aumento de 20 x. O restante do lavado foi armazenado a -80 °C em tubos eppendorfs para posterior dosagem de mieloperoxidase.

### 3.2.3.3 Determinação da Atividade da Mieloperoxidase

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima presente predominantemente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos e tem sido utilizada como um marcador quantitativo da infiltração de neutrófilos nos processos inflamatórios (POSADAS et al., 2004).

Utilizando a técnica descrita por Bradley et al. (1982), sete microlitros do lavado articular foram pipetados (em duplicata) em microplaca de 96 poços e acrescidos de 200 uL de uma solução de tampão fosfato de potássio (pH=6) contendo 0,164 mg/mL de dihidroclorato de o-dianisidina (Sigma Chemical Co., EUA) e 0,0005% de peróxido de hidrogênio (Merck, Alemanha). A unidade da atividade de MPO foi definida como aquela capaz de converter 1 µmol de peróxido de hidrogênio em água em 1 minuto a 22 ° C. Durante o ensaio, à medida que o peróxido de hidrogênio for degradado ocorrerá a produção do ânion superóxido, responsável pela conversão de o-dianosidina em um composto de cor marrom. A mudança de absorbância foi medida a 450 nm em um leitor de microplacas (Spectra Max

plus 384, EUA), e os valores de velocidade máxima de reação ( $V_{max}$ ) foram determinados e relacionados à atividade de MPO presentes nas amostras.

#### 3.2.3.4 Análise Histológica da Articulação Temporomandibular

As articulações retiradas foram acondicionadas em formol 10 % tamponado por 24 h. Em seguida, foram lavadas intensamente para posterior submersão em ácido fórmico 7 %, realizando troca em dias alternados por no máximo 10 dias. As articulações foram lavadas novamente, submersas em álcool 70 %, embebidos em parafina e seccionadas no longo eixo da ATM, em secções de 5  $\mu$ m, que incluíam cabeça da mandíbula, cartilagem articular, tecido periarticular e disco articular montados em lâminas de vidro para posterior análises de histologia e imunohistoquímica.

Os cortes histológicos foram corados pelos métodos de hematoxilina-eosina (H&E) e avaliados em um microscópio de luz Leica acoplado a um computador com aumento de 40x ou 100x, sob os seguintes parâmetros: infiltrado celular sinovial, infiltrado no tecido periarticular e infiltrado celular no tecido muscular. Tais achados foram classificados de acordo com os escores 0 a 4 de acordo com a intensidade, caracterizando escore 0 ausência dos parâmetros, 1 discreto, 2 leve, 3 moderado e 4 severo (CHAVES et al., 2011). A análise foi realizada por uma patologista através de estudo cego.

#### 3.2.3.5 Domínio lectínico da LCc

Para realizar a análise da importância do domínio lectínico da LCc nos possíveis efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório, LCc (10 mg/kg) foi incubada com seu hapteno mucina (100 mg/kg) durante 12 h à 37 °C e aplicada por via i.v nos animais 30 min antes da indução da artrite por Zy. Para descartar um possível efeito da glicoproteína mucina sobre a nocicepção e inflamação, esta também foi aplicada (100 mg/kg) isoladamente 30 min antes do estímulo.

#### 3.2.3.6 Dosagem da Citocina IL-1 $\beta$

Na 6<sup>a</sup> hora após a injeção do Zy, os animais foram anestesiados com tribromoetanol (1 mL/ 100 g; i.p.) e sacrificados por exsanguinação. A pele foi removida, e o tecido periarticular coletado em eppendorfs e armazenados em freezer -80°C para posterior

dosagem de IL-1 $\beta$ . Para ter acesso ao gânglio trigeminal, que fica alojado na base do crânio na região de cavo trigeminal no osso temporal, foi removida calota craniana e o cérebro, e cautelosamente identificado e removido o gânglio trigeminal. Amostras do tecido periarticular e gânglio trigeminal foram homogeneizadas em solução RIPA (Santa Cruz, USA). Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas (10.000 RPM/10 min/4 °C), e o sobrenadante foi utilizado para avaliar a expressão de IL-1 $\beta$ , realizada pelo método de ELISA, usando o Kit (R&D Systems®, Kit Quantikine\_rat IL-1 $\beta$  immunoassay, catálogo RLB00, EUA), seguindo o protocolo do fabricante. Resumidamente, a placa de 96 poços foi incubada por 2 h à temperatura ambiente com 50  $\mu$ L/poço com as soluções padrão, amostra e controle e com o diluente de ensaio RD1-54 para IL-1 $\beta$ . Posteriormente, a placa foi lavada quatro vezes com 400  $\mu$ L de tampão de lavagem e incubada novamente por mais duas horas com 100  $\mu$ L de conjugado de IL-1 $\beta$  por poço. Após as duas horas, a placa foi lavada novamente e incubada por mais 30 minutos com 100  $\mu$ L da solução substrato, sendo a placa protegida da luz. Em seguida foi adicionada a placa 100  $\mu$ L da solução de parada em cada poço e a absorbância foi medida a 450 nm. O resultado foi expresso em pg/mL.

### 3.2.3.7 Imunohistoquímica da ATM para TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ e HO-1

Para realização de imunohistoquímica, os espécimes foram novamente submetidos a cortes de 4  $\mu$ m de espessura e montados em lâminas de vidro previamente preparadas com adesivo à base de organossilano (3-aminopropyltriethoxi-silano Sigma Chemical Co<sup>®</sup>, St Luis, MO, EUA).

Os cortes foram submetidos aos anticorpos TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e HO-1 utilizando método de estreptavidina-biotina (HSU & RAINE, 1981). Resumidamente, os cortes histológicos da ATM foram desparafinizados e reidratados em xilol e álcool.

A recuperação antigênica foi realizada com citrato em pH 6,0 em panela pressurizada (Pascal), a  $\pm$  22-25 PSI, durante 30 seg à temperatura de 126 °C. Após retornar à temperatura ambiente, foi realizado bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 3 % durante 10 min. Os cortes foram incubados com anticorpo primário de coelho anti-TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e HO-1 (ABCAM<sup>®</sup>), durante 1 h à temperatura ambiente, na diluição de 1:300 em PBS com albumina sérica bovina (PBS-BSA), e, posteriormente, lavados com solução de PBS.

Os cortes foram então incubados com o anticorpo secundário LSAB Kit (DAKO<sup>®</sup>, Carpinteria, CA, EUA) por 10 min. à temperatura ambiente. Em seguida, foi feita

incubação em solução cromógena preparada com 3,3'-diaminobenzidina (DAB), durante 5 min em câmara escura. Controles negativos foram processados simultaneamente como descritos acima, porém o anticorpo primário foi substituído por PBS-BSA 5 %. Os cortes foram então lavados em água corrente e, em seguida, com água destilada. A contra-coloração foi realizada com hematoxilina, seguida de desidratação em uma série de concentrações de álcool, diafinizadas em xilol e, por fim, a lamínula foi colocada. Como controle positivo foi utilizado corte da ATM que foi submetido ao mesmo protocolo.

As lâminas foram avaliadas em microscópio NIKON Eclipse E200, e fotografadas em microscópio LEICA acoplado a computador.

Os parâmetros de positividade da marcação imunohistoquímica do antígeno em todos os cortes incluídos consistiram nas células que exibiram coloração acastanhada no seu citoplasma, independente da intensidade de imunomarcação.

### 3.2.3.8 Avaliação do Possível Envolvimento da Via da HO-1 na Resposta Nociceptiva e Inflamatória

Para avaliar o possível envolvimento da Via da HO-1 no efeito antinociceptivo e anti-inflamatório de LCc, um grupo de animais foram pré-tratados com zinco protoporfirina (ZnPP IX) (3 mg/kg; s.c.), inibidor seletivo da HO-1, diluído em solução tampão carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 50 mM, 30 min. antes da injeção intravenosa da LCc (10 mg/kg).

Após o período de 1 h da injeção subcutânea do ZnPP IX ou salina estéril 0,9 %, os grupos de animais tratados com LCc (10 mg/kg; i.v.) ou salina, receberam uma injeção de Zy (2 mg/art.; 40  $\mu\text{L}$ ) ou salina, e 4 h depois a hipernocicepção mecânica foi verificada. Na 6<sup>a</sup> hora, os animais foram anestesiados com tribromoetanol e eutanasiados por exsanguinação. Em seguida, foi realizada a contagem do influxo celular do lavado sinovial, a dosagem de mieloperoxidase do lavado sinovial e a coleta da ATM para posteriores análise histológica e imunohistoquímica (CHAVES et al., 2011).

### 3.2.3.9 Análise do Envolvimento da Via Opioide Durante o Efeito da LCc na Nocicepção

Na perspectiva de avaliar se o efeito antinociceptivo da LCc (10 mg/kg; i.v) está, de maneira geral, envolvida na ativação do sistema opioide periférico foi realizada a injeção intra-articular do antagonista opioide naloxona (10  $\mu\text{g/art.}$ ; 15  $\mu\text{L}$ ) 5 min antes da injeção intravenosa da LCc (10 mg/kg) ou morfina (5 mg/kg; s.c.) (EISENBERG et al., 1996). Após o

período de 30 min da injeção intravenosa de LCc, os grupos de animais tratados receberam uma injeção intra-articular de Zy (2 mg/art.; 35 µL) ou salina estéril 0,9 % na ATM esquerda de ratos. Na 4ª h a hipernocicepção mecânica foi avaliada. O volume total aplicado na ATM foi de 50 µL quando duas drogas foram injetadas na mesma ATM.

#### *3.2.4 Análise Estatística dos Dados*

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Para comparação múltipla dos dados paramétricos foi utilizado a análise de variância (ANOVA) e o nível de significância entre os grupos foram determinados pelos testes Bonferroni para detectar as diferenças entre o grupo controle e os grupos em tratamento.

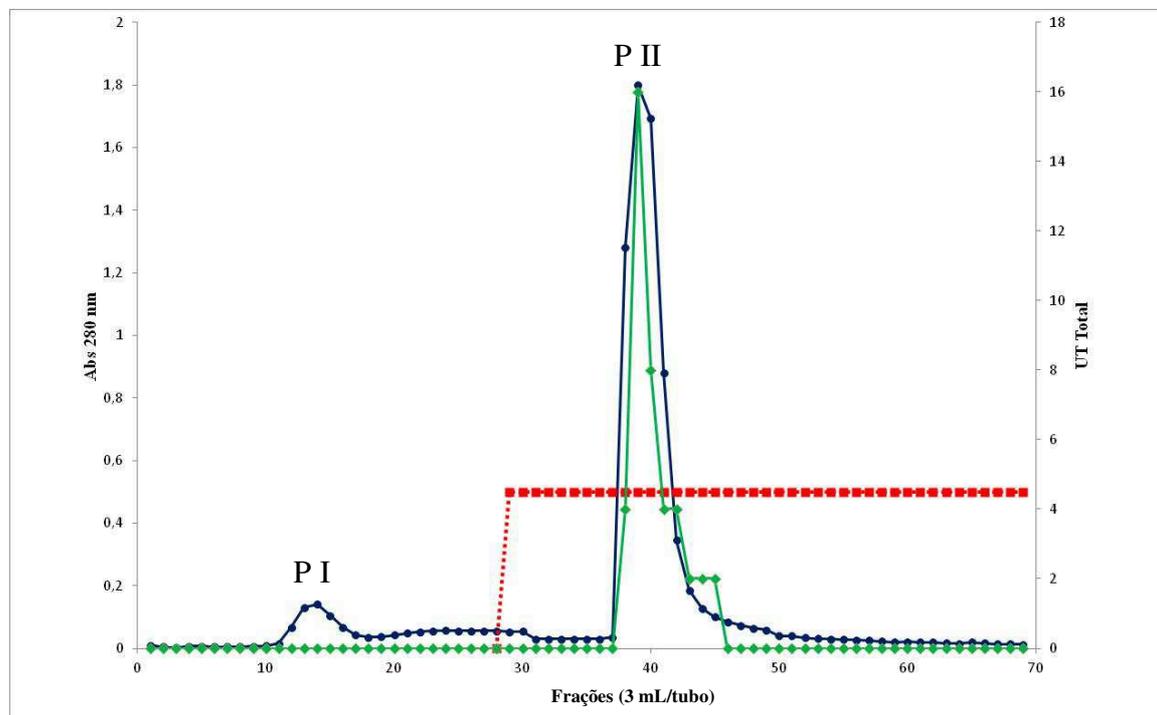
Para dados não paramétricos, os resultados foram expressos em medianas e avaliados através do teste Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn's. O número (n) de animais por grupo experimental foi no mínimo de 6. Foi considerado significante  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Extração e Purificação da Lectina da Alga Marinha Verde *Caulerpa cupressoides*

O extrato proteico total foi obtido por extração em tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, e aplicado em cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose. O cromatograma revelou a presença de dois picos proteicos, no qual o primeiro pico (P I), não retido na coluna, eluído com o mesmo tampão de equilíbrio da coluna (TB) mostrou-se isento de atividade hemaglutinante. O segundo pico (P II), eluído com TB contendo 0,5 M de NaCl apresentou atividade hemaglutinante, sendo denominado de LCc (**Figura 7**).

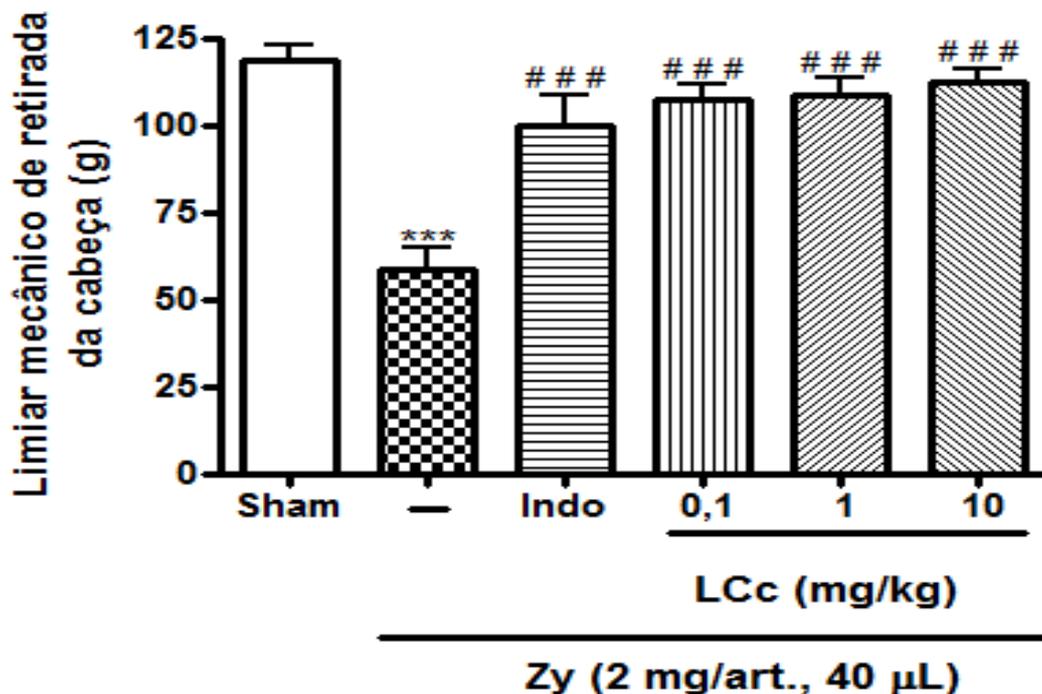
**Figura 7- Cromatografia de Troca Iônica em Coluna de DEAE-Celulose do Extrato Total da Alga *Caulerpa cupressoides*.** O pico não retido (P I) foi eluído com o tampão de equilíbrio (TB), e o pico adsorvido na coluna (P II) eluído com tampão TB contendo NaCl 0,5 M. Foram coletadas frações de 3 mL/tubo. (●—●) Absorbâncias a 280 nm; (◆—◆) Atividade hemaglutinante total (UH Total). (■) Eluição das frações com o TB contendo NaCl 0,5 M.



#### 4.2 Efeitos Antinociceptivo e Anti-inflamatório de LCc no Modelo de Artrite Induzida por Zy na ATM de ratos

A injeção de Zy (2 mg/art., 40  $\mu$ L) na ATM esquerda de ratos induziu a hipernocicepção mecânica, reduzindo o limiar de resposta nociceptiva, ( $58,36 \pm 6,400$  g) de forma significativa em comparação ao grupo sham ( $118,8 \pm 4,191$  g). A avaliação foi feita através da observação do limiar de reflexo da retirada da cabeça em resposta à aplicação de uma força (g) de intensidade crescente à articulação. O pré-tratamento com LCc (0,1; 1 e 10 mg/kg; i.v.), administrada 30 min antes do agente pró-inflamatório, promoveu uma redução da hipernocicepção mecânica ( $p < 0,001$ ) na ordem de 81 ( $107,3 \pm 4,381$  g), 83 ( $108,5 \pm 5,185$  g) e 89,5% ( $112,5 \pm 3,410$  g), respectivamente, na 4<sup>a</sup> h após a injeção de Zy. A LCc em todas as doses testadas teve um efeito superior ao AINE indometacina que promoveu um efeito analgésico significativo de 69% ( $99,86 \pm 8,446$  g,  $p < 0,01$ ) (Figura 8).

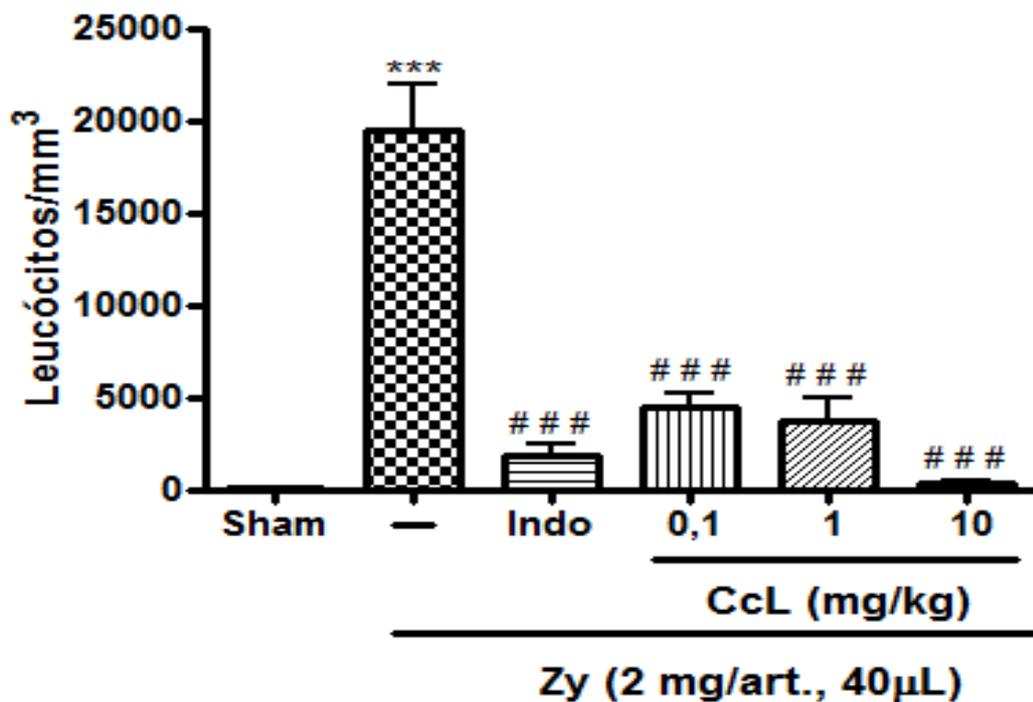
**Figura 8- Efeito Antinociceptivo da LCc na Hipernocicepção Mecânica Induzida por Zy na ATM de ratos**. Zy (2 mg/ art., 40  $\mu$ L) ou solução salina foi injetado i.art. na ATM esquerda dos ratos. Indometacina (5 mg/kg) foi administrado s.c. 1 hora antes do estímulo. Os animais receberam solução salina 0,9% (i.v.) ou LCc (0,1, 1 e 10 mg/kg; i.v.). Os dados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. de seis animais por grupo (ANOVA, Teste de Bonferroni). \*\*\* P <0,001 indica diferença significativa em relação ao grupo sham. # # # P <0.001 indica diferença significativa em relação ao grupo Zy.



Com relação ao efeito inflamatório induzido por Zy (2 mg/art. 40  $\mu$ L) na ATM foi demonstrado um aumento significativo no número de células polimorfonucleares ( $19494 \pm 241$  células/ $\text{mm}^3$ ) no lavado sinovial dos animais, comparado ao grupo sham ( $31,250 \pm 6,25$  células/ $\text{mm}^3$ ).

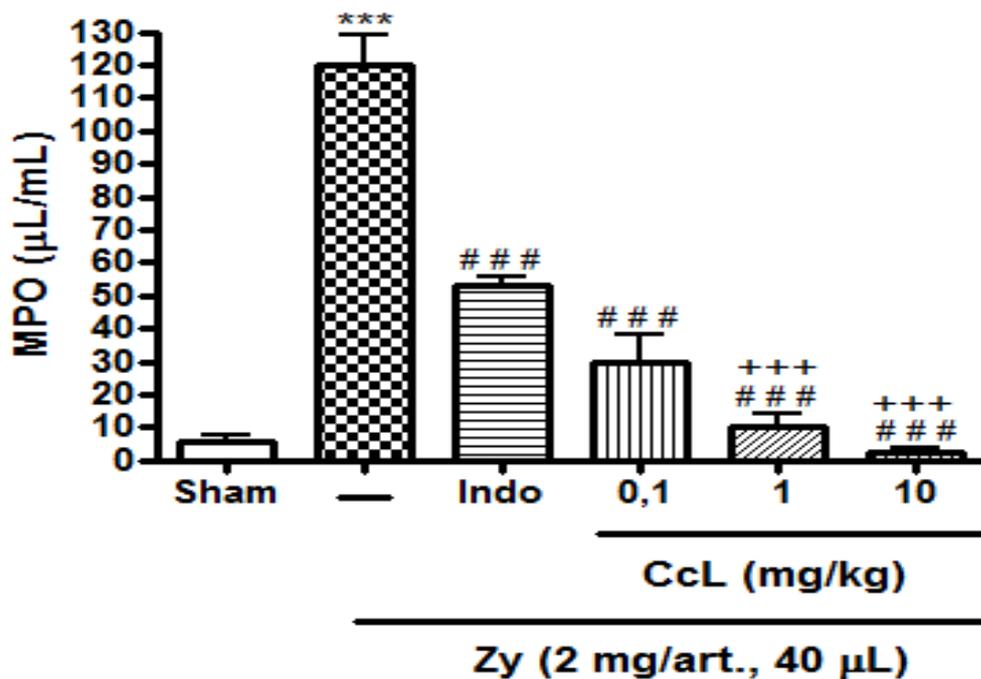
A administração de LCc (0,1; 1 e 10 mg/kg, i.v), 30 mim antes da injeção de Zy na ATM de ratos reduziu ( $p < 0,001$ ), o influxo celular no lavado sinovial em 77,3 ( $4432 \pm 808,5$  células/ $\text{mm}^3$ ), 80,7 ( $3747 \pm 1233$  células/ $\text{mm}^3$ ) e 98,5 % ( $295,5 \pm 155,6$  células/ $\text{mm}^3$ ), respectivamente, em comparação com o grupo de Zy, mostrando, portanto, uma inibição de maneira dose-dependente (**Figura 9**). O efeito anti-inflamatório da LCc na sua maior dose (10 mg/kg) foi superior que a indometacina, que promoveu uma inibição na contagem dos leucócitos no lavado sinovial de 90,7 % ( $1810 \pm 638,1$  células/ $\text{mm}^3$ ;  $p < 0,001$ ).

**Figura 9- Efeito da LCc na Contagem de Células do Lavado Sinovial da ATM de ratos.** Zy (2 mg/art., 40  $\mu$ L) ou solução salina foi injetado i.art. na ATM esquerda dos ratos. Indometacina (5 mg/kg) foi administrado s.c. 1 hora antes do estímulo. Os animais receberam solução salina 0,9% (i.v.) ou de LCc (0,1; 1 e 10 mg/kg; i.v.). Os dados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. de seis animais por grupo (ANOVA, Teste de Bonferroni). \*\*\* P <0,001 indica diferença significativa em relação ao grupo sham. # # # P <0.001 indica diferença significativa em relação ao grupo Zy.



A redução da contagem de leucócitos no lavado sinovial da ATM de ratos foi confirmada através da dosagem da MPO. O aumento de neutrófilos observado na 6<sup>a</sup> h, após indução de artrite por Zy, foi obtido indiretamente por dosagem da atividade da MPO no lavado sinovial da ATM. Os resultado obtidos mostram que os grupos de animais tratados com LCc (0,1; 1 e 10 mg/kg; i.v.) apresentaram uma redução da atividade enzimática em 63 (29,52 ± 8,882), 92 (9,886 ± 4,480) e 98% (2.440 ± 1.205), respectivamente (p<0,001) em comparação ao grupo Zy (**Figura 10**). Portanto, esses resultados demonstram que a LCc em todas as doses testadas apresentou um efeito superior ao da indometacina (5 mg/kg, s.c.), que reduziu a atividade da MPO em 55,5% (53,31 ± 2.156).

**Figura 10- Efeito da LCc sobre a Atividade da MPO no Fluido Sinovial na Artrite Induzida por Zy na ATM de Ratos.** Zy (2 mg/art., 40 µL) ou solução salina foi injetado i.art. na ATM esquerda dos ratos. Indometacina (5 mg/kg) foi administrado s.c. 1 hora antes do estímulo. Os animais receberam solução salina 0,9% (i.v.) ou de LCc (0,1, 1 e 10 mg/kg; i.v.). Os dados estão expressos como média ± E.P.M. de seis animais por grupo (ANOVA, Teste de Bonferroni). \*\*\* P <0,001 indica diferença significativa em relação ao grupo sham. ### P <0,001 indica diferença significativa em relação ao grupo Zy e +++ P <0,001 indica diferença significativa em relação ao grupo indometacina.



A redução obtida para o processo inflamatório na ATM de ratos foi confirmada por análise histológica. Os resultados dos diferentes grupos estão demonstrados na **Tabela 1**, que apresenta as pontuações atribuídas às alterações histológicas da ATM de ratos comparando os valores entre os grupos Sham (salina, i.art, 40 µL), Zy (2 mg/i.art., 40 µL) e LCc (0,1; 1,0 e 10 mg/kg, i.v.).

**Tabela 1 - Análise Histológica da ATM de Ratos com Artrite Induzida por Zy e Tratados com LCc.** \*p < 0,05 em relação ao grupo sham, #p < 0,05 em relação ao grupo Zy. (Kruskal-Wallis, Dunn's).

Grupos	Inf. Cel. Memb. Sinovial	Inf. Cel. Tec. Periarticular	Inf. Cel. Tec. Muscular
Sham	0(0-0)	0(0-0)	0(0-0)
Zy	4 (3-4)*	4 (3-4)*	2 (2-3)*
LCc 0,1	2 (1-3)	3 (2-4)	2 (0-3)
LCc 1	1 (1-3)	2 (1-3)	1,5 (1-2)
LCc 10	0 (0-0) #	1 (1-1) #	0 (0-2) #

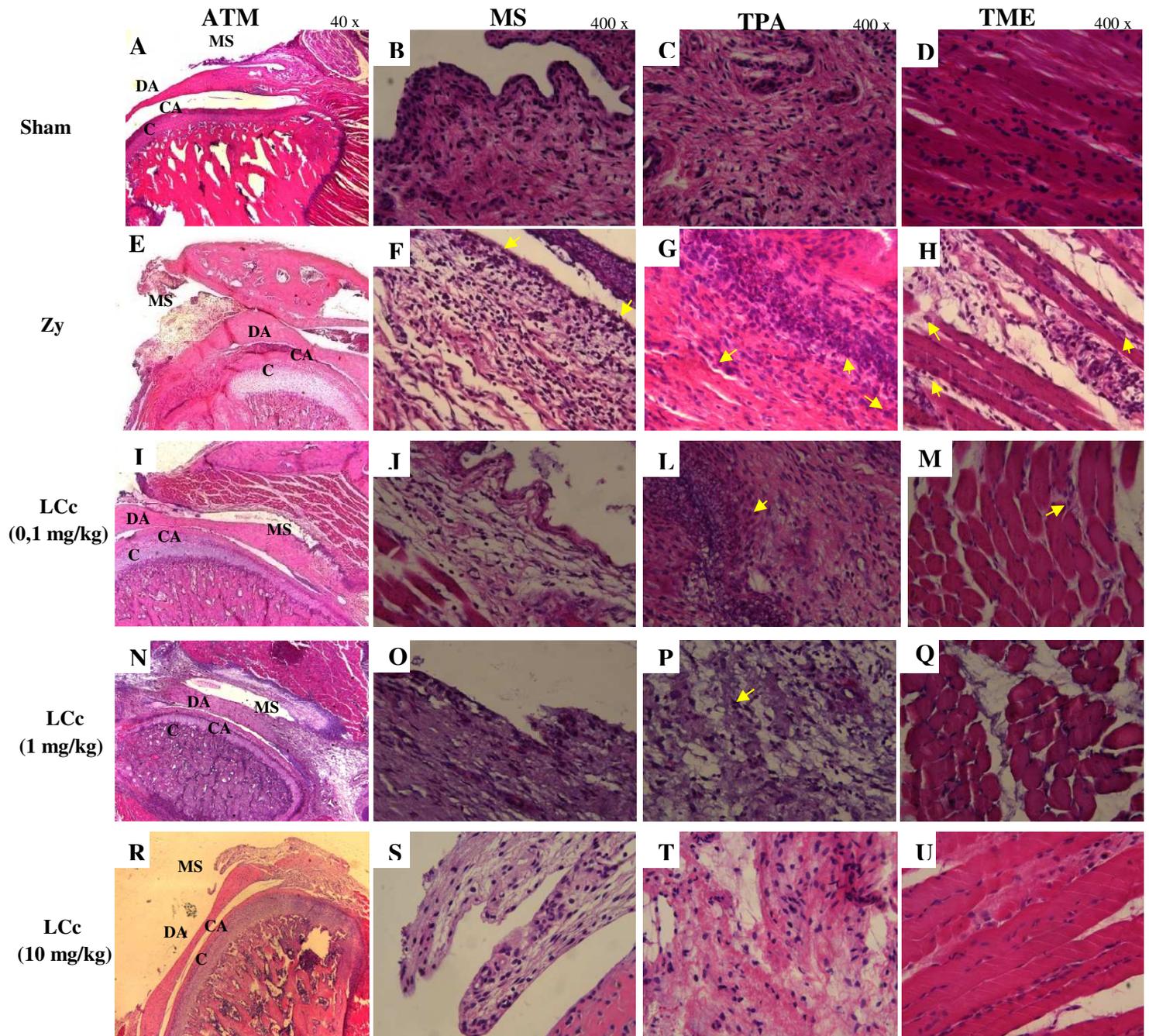
0 – ausência; 1- discreto; 2 - leve; 3 – moderado e 4 – intenso.

Na análise histológica da ATM, corada por HE, podemos observar na **Figura 11 (A)** o corte sagital da ATM esquerda de animais do grupo Sham em aumento de 40 x, mostrando a cabeça da mandíbula (C), recoberta pela cartilagem articular (CA), com o disco articular superiormente situado (DA) acima da cabeça da mandíbula e a membrana sinovial (MS) situada na extremidade anterior, circundada por tecido muscular esquelético (TME). Na **Figura 11 (B, C e D)** é visualizado a membrana sinovial, o tecido periarticular e o tecido muscular (400 x), respectivamente, onde podem ser observados parâmetros de normalidade sem infiltrado celular inflamatório ou edema.

Seis horas após a indução da artrite por Zy na ATM de ratos, foi observado processo inflamatório intenso, com influxo de células inflamatórias na membrana sinovial e tecido periarticular, enquanto que no tecido muscular esquelético foi verificado um processo inflamatório de leve a moderado. Além disso, também foi observado um espessamento na membrana sinovial. Os tipos celulares predominantemente encontrados foram neutrófilos, que caracterizam a inflamação aguda. O pré-tratamento com LCc (0,1; 1,0 e 10 mg/kg, i.v) reduziu (p < 0,05) o infiltrado celular e edema na membrana sinovial, nos tecidos periarticular e muscular esquelético na maior dose testada (10 mg/kg, i.v), quando comparado com o grupo Zy (**Figura 11**).

**Figura 11- Fotomicrografias da ATM de Ratos com Artrite Induzida por Zy e Tratados com LCc.**

(A) Grupo Sham (40 x) (B, C e D) Membrana sinovial, tecido periarticular e tecido muscular esquelético sem infiltrado celular do grupo Sham (400 x), respectivamente (E) Grupo Zy (2mg/art., 40 µL) (40 x). (F, G e H) Membrana sinovial, tecido periarticular e tecido muscular do grupo Zy com infiltrado celular intenso (400 x), respectivamente. (I) LCc (0,1 mg/kg, i.v.) (40 x). (J, L e M) Membrana sinovial, tecido periarticular e tecido muscular do grupo tratado com LCc 0,1 mg/kg com infiltrado celular de leve a moderado (400 x), respectivamente. (N) LCc (1 mg/kg, i.v.) (40 x). (O, P e Q) Membrana sinovial, tecido periarticular e tecido muscular do grupo tratado com LCc 1 mg/kg apresentando infiltrado celular de leve a moderado (400 x), respectivamente. (R) LCc (10 mg/kg, i.v.) (40 x). (S, T e U) Membrana sinovial, tecido periarticular e tecido muscular do grupo tratado com LCc 10 mg/kg sem infiltrado celular (400 x) respectivamente C: cõndilo; CA: artilagem articular; DA: disco articular; MS: membrana sinovial; TPA: Tecido periarticular; TME: tecido muscular esquelético. Coloração de hematoxilina e eosina. Setas amarelas indicam neutrófilos.



Chaves et al. (2011) observaram que a injeção de zymosan na ATM de ratos promove intenso infiltrado celular, predominantemente neutrofílico, na membrana sinovial, nos tecidos conjuntivo periarticular e muscular esquelético. Sendo o primeiro trabalho a relacionar os parâmetros inflamatórios agudos e crônicos envolvendo as estruturas articulares e periarticulares da ATM, no qual é atribuído escores para análise estatística dessas estruturas (GOULART et al., 2005).

Diante do exposto, o processo inflamatório na região da ATM reduz o limiar nociceptivo na região da articulação e nos tecidos ao redor da mesma. Os modelos animais de artrite auxiliam na elucidação da fisiopatologia e permitem o estudo sobre tratamentos que amenizem ou inibem os processos inflamatórios envolvidos na doença (CAIRNS, 2010).

O presente trabalho é o primeiro a relatar os efeitos de uma lectina de alga marinha no modelo de artrite induzida por Zy na ATM de ratos. Esses resultados corroboram com estudos encontrados na literatura para LCc, nos quais foram mostrados os efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório dessa lectina em modelos clássicos de nocicepção em camundongos (teste de contorção, teste de formalina e placa quente) e inflamação aguda em ratos (edema de pata) (VANDERLEI et al., 2010; QUEIROZ, 2013). Adicionalmente, reforçam a relevância do papel de lectinas de algas marinhas em condições de dor e inflamação *in vivo*.

As lectinas das algas marinhas vermelhas *P. capillacea*, *H. cervicornis* e *S. filiformis* também possuem efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório em modelos clássicos de dor e inflamação reportados na literatura (SILVA et al., 2010; BITENCOURT, 2007; ABREU, 2012). Figueiredo et al. (2010) descobriram que a lectina da alga marinha vermelha *H. musciformis* possui efeito anti-hipernociceptivo em modelos de hipernocicepção inflamatória induzida por carragenana, ovalbumina e prostaglandinas E<sub>2</sub> na pata de ratos, esse efeito foi associado à inibição da migração neutrofílica observado através da diminuição da atividade da mieloperoxidase e ao aumento da produção de óxido nítrico.

Em estudo realizado por Paim (2006) com a lectina obtida de sementes da planta *Dioclea violace* (Dviol) foi verificado que ela apresenta atividade anti-inflamatória em modelo de artrite induzida por Zy na pata de ratos, promovendo, de maneira dose-dependente, uma significativa inibição do influxo celular na articulação inflamada quando injetada por via endovenosa. No entanto, quando Dviol foi aplicada localmente, ocorreu um aumento da incapacitação articular, sugerindo um efeito hipernociceptivo.

Um estudo recente com polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *S. filiformis* mostrou que uma fração polissacarídica reduziu a hiperalgesia no modelo de artrite

induzida por Zy na ATM de ratos, porém não foi capaz de reduzir o infiltrado celular do lavado sinovial (ARAÚJO, 2012). No entanto, é reportado na literatura que polissacarídeos sulfatados de algumas espécies de algas marinhas são capazes de reduzir a inflamação em articulações de joelho de ratos além dos glicosaminoglicanos (GAGs) que apresentam eficácia no tratamento da artrite (SANDYA & SUNDHAKARAN, 2007).

Cardoso et al. (2009) relataram os efeitos dos polissacarídeos sulfatados totais da alga marinha parda *Fucus vesiculosus* na artrite induzida por Zy (1 mg/art; 50µL) na articulação do joelho de ratos. Esses polissacarídeos quando injetados, por via intraperitoneal, reduziram o influxo de leucócitos na membrana sinovial e a quantidade de óxido nítrico produzido durante o processo inflamatório após a indução da artrite. Em concordância com esses resultados, Paiva et al. (2011) utilizando o mesmo modelo de artrite induzida por Zy na articulação do joelho de ratos, demonstraram uma redução do número de leucócitos no fluido sinovial de animais tratados com polissacarídeos sulfatados da alga marinha parda *Lobophora variegata*.

Dados semelhantes aos nossos resultados foram obtidos para o extrato etanólico da planta *Tephrosia toxicaria* (Tt) e seus metabólitos secundários (Deguelina, 6a, 12a-desidro- $\alpha$ -toxicarol e Obovatina), que apresentaram efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório, aumentando o limiar de hipernocicepção mecânica, diminuindo significativamente a migração de leucócitos e a atividade da MPO na artrite induzida por zymosan na ATM de ratos (VAL, 2012).

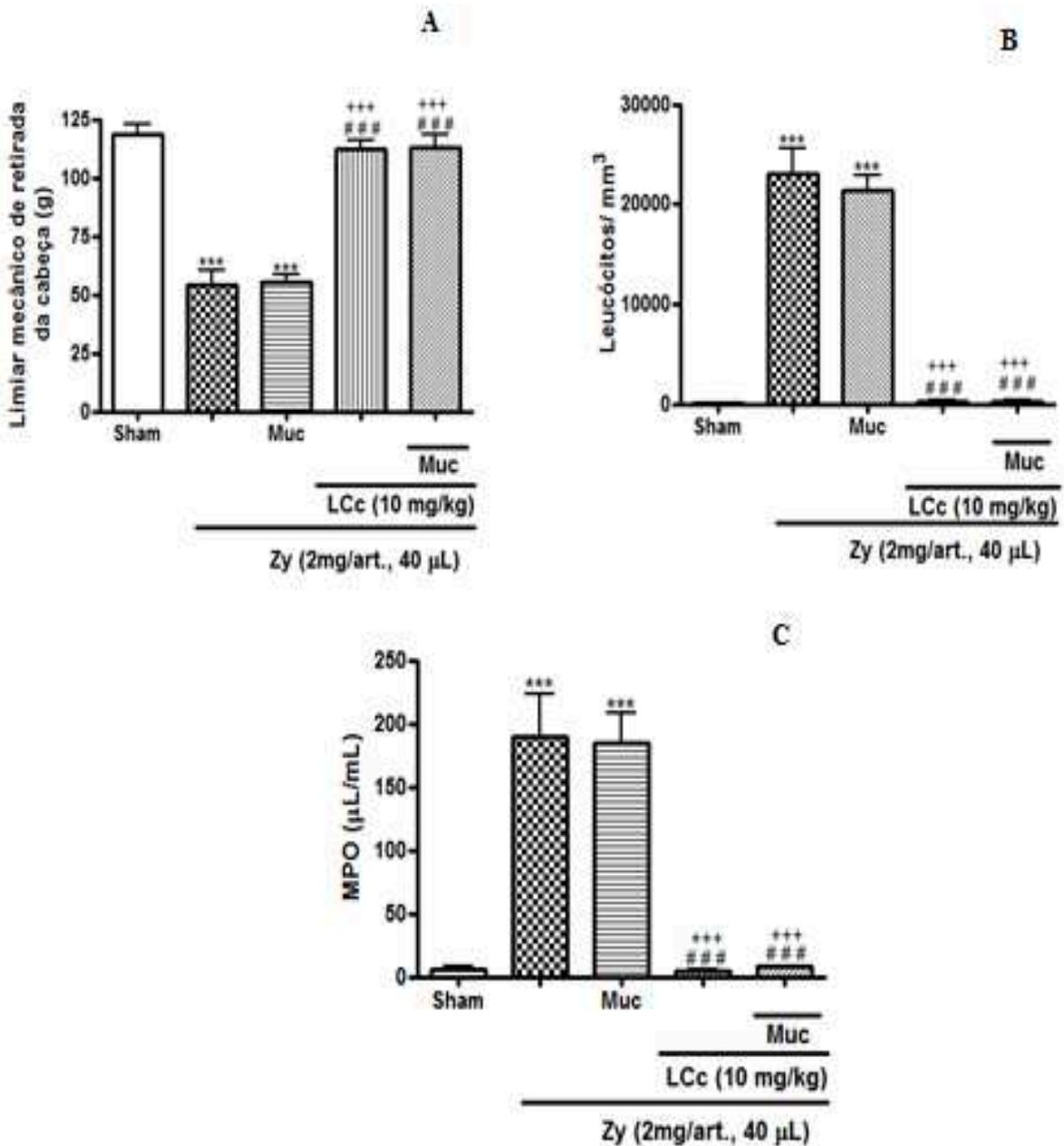
Considerando que os neutrófilos são as células predominantes no exsudato articular da fase aguda da artrite induzida por zymosan (CHAVES et al., 2011; ROCHA et al., 1999), o efeito inibitório da LCc revela um possível efeito protetor na lesão articular. De fato, a inibição da migração de neutrófilos está direta e positivamente associada com o benefício terapêutico em artropatias inflamatórias (LEFKOWITZ et al., 1999).

#### 4.2.1 Análise do Domínio Lectínico da LCc

Para avaliar se o sítio lectínico da LCc é essencial para o seu efeito antinociceptivo e anti-inflamatório, associamos LCc (10 mg/kg, i.v.) ao seu açúcar ligante mucina (100 mg/kg, i.v) nos experimentos de hipernocicepção mecânica, contagem de leucócitos e dosagem de MPO. Os resultados encontrados mostram que a presença da mucina não foi capaz de inibir os efeitos da LCc. No entanto, quando mucina foi administrada isoladamente não foi capaz de reduzir a nocicepção e inflamação (**Figura 12**).

Podemos sugerir duas hipóteses para esses resultados, a primeira seria que o sítio da LCc responsável pelos efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório seja diferente do sítio de ligação ao açúcar. Nesse sentido, LCc poderia ser classificada como uma quimerolectina, que possui além do domínio de ligação a carboidratos um outro domínio não relacionado, o qual pode apresentar qualquer outra atividade biológica, atuando independentemente do domínio de ligação ao açúcar (PEUMANS & VAN DAMME, 1998). A segunda hipótese seria que a ligação da LCc com seu hapteno mucina teria sido desfeita antes da avaliação da nocicepção e inflamação *in vivo*, que ocorre apenas na 4 e na 6<sup>a</sup> h, respectivamente, após a indução da artrite.

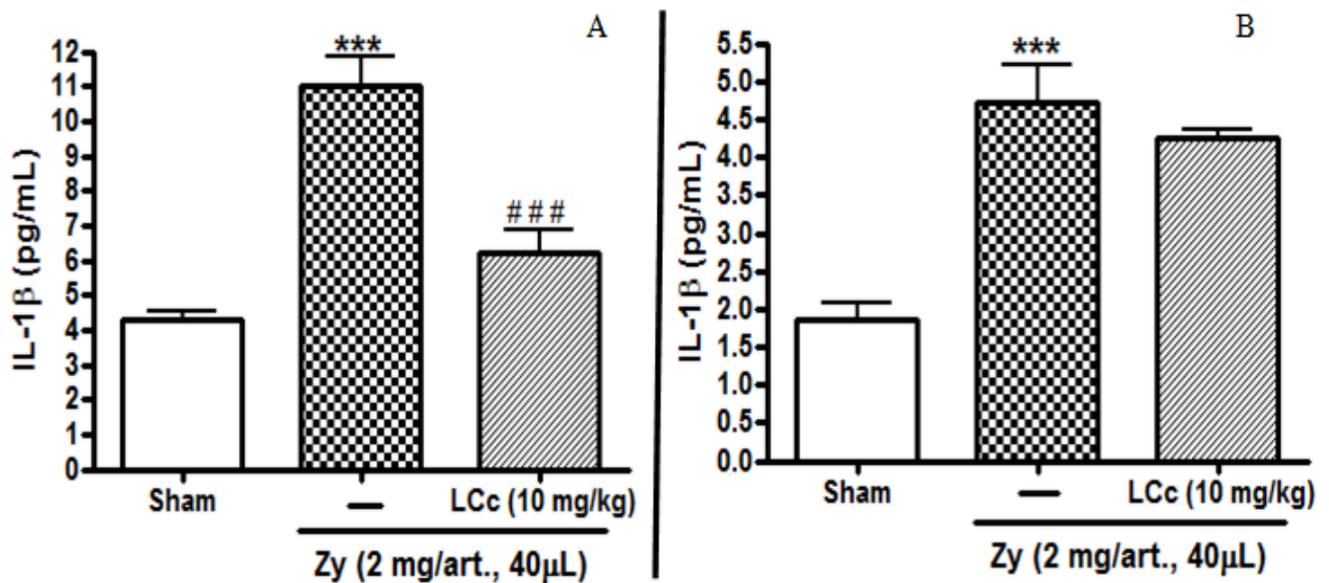
**Figura 12- Efeito da LCc Associado à Mucina no Modelo de Artrite Induzida por Zy na ATM de Ratos.** (A) Hipernociceção mecânica; (B) influxo de leucócitos e (C) atividade da MPO. Zy (2 mg, 40  $\mu$ L) ou solução salina foram injetados i.art. na ATM esquerda dos ratos. Os animais receberam solução salina 0,9% (i.v.), LCc (10 mg/kg; i.v.), LCc (10 mg/kg; i.v.) associado à mucina (100 mg/kg; i.v.) ou mucina (100 mg/kg; i.v.). Os dados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. de seis animais por grupo (ANOVA, Teste de Bonferroni). \*\*\*  $p < 0,001$  indica diferença significativa em relação ao grupo sham. ###  $p < 0,001$  indica diferença significativa em relação ao grupo Zy e +++  $p < 0,001$  indica diferença significativa em relação ao grupo mucina.



#### 4.2.2 Avaliação da Dosagem da Citocina IL-1 $\beta$

A injeção de Zy na ATM induziu um aumento significativo dos níveis de IL-1 $\beta$  no tecido periarticular ( $11,0 \pm 0,8$  pg/mL) e no gânglio trigeminal ( $4,7 \pm 0,46$  pg/mL) em relação aos grupos Sham (tecido periarticular:  $4,3 \pm 0,2$  pg/mL; gânglio trigeminal:  $1,8 \pm 0,2$  pg/mL) na 6<sup>a</sup> h após a indução da artrite. No tecido periarticular, o tratamento com LCc (10 mg/kg) reduziu significativamente ( $p < 0,001$ ) os níveis de IL-1 $\beta$  em 43% ( $6,2 \pm 0,6$  pg/mL) com relação ao grupo Zy, contudo, não foi observada inibição significativa ( $4,2 \pm 0,12$  pg/mL) nos níveis dessa citocina no gânglio trigeminal (**Figura 13**).

**Figura 13- Efeito de LCc na Produção de IL-1 $\beta$  no Tecido Periarticular (A) e no Gânglio Trigeminal (B) da ATM de Ratos com Artrite Induzida por Zy.** Zy (2 mg/art., 40  $\mu$ L) ou solução salina foram injetados i.art. na ATM esquerda dos ratos. Os animais receberam solução salina 0,9% (i.v.) ou LCc (10 mg/kg; i.v.). Na 6<sup>a</sup> hora, após a administração de Zy os animais foram eutanasiados e retirado o tecido periarticular e o gânglio trigeminal para quantificação de IL-1 $\beta$ . \*\*\*  $p < 0,001$  indica diferença significativa em relação ao grupo sham. # #  $p < 0,001$  indica diferença significativa em relação ao grupo Zy.



A gênese da hiperalgesia inflamatória envolve o aumento de citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (CUNHA et al., 2005). A IL-1 $\beta$  é considerada um dos elementos centrais no desenvolvimento da artrite reumatoide, especialmente por promover o aumento na secreção de citocinas e produção de metaloproteinases (MMPs) que são responsáveis pelo processo inflamatório e destruição da cartilagem articular (DINARELLO, 2011a, b; KOSTRZEWA-JANICKA et al., 2012). Rodrigues (2012) demonstrou em seu estudo, que a IL-1 $\beta$  desempenha um papel mais relevante na fase inicial do que na fase tardia da artrite reumatoide. Essa informação torna-se importante, ao indicar uma introdução precoce de tratamentos terapêuticos direcionados às vias reguladoras de IL-1 $\beta$ . Dentro desta perspectiva, nossos resultados ganham relevância, já que a LCc mostrou efeito inibitório sobre essa citocina para o tecido periarticular em uma fase inicial da artrite induzida por Zy.

O tratamento com LCc não reduziu significativamente os níveis de IL-1 $\beta$  no gânglio trigeminal como aconteceu no tecido periarticular. Desta forma, podemos sugerir, após uma análise mais cuidadosa da figura 13 (B), que isso tenha ocorrido, provavelmente, devido ao fato que, no gânglio trigeminal o Zy induziu uma produção no nível de IL-1 $\beta$  bem inferior quando comparado aos níveis produzidos dessa citocina no tecido periarticular (figura 13 (A)). Além disso, como já mencionado anteriormente, o modelo de artrite utilizado nesse estudo promove um pico de dor na 4<sup>a</sup> h após a indução com Zy, no entanto, realizamos a coleta do gânglio trigeminal apenas na 6<sup>a</sup> h, que corresponde ao pico de inflamação, essa condição pode ter sido a causa para a baixa produção da IL-1 $\beta$  no gânglio trigeminal.

A liberação de IL-1 $\beta$  no tecido periférico estimula a síntese de PGs, especialmente, da PGE<sub>2</sub>, que leva a sensibilização dos nociceptores aferentes primários induzindo a hiperalgesia inflamatória. A IL-1 $\beta$  também é liberada no gânglio da raiz dorsal, estrutura análoga ao gânglio trigeminal, entretanto a função que essa citocina desempenha nessas estruturas para o desenvolvimento da hiperalgesia inflamatória ainda não está bem esclarecida. Estudos sugerem que a sensibilização dos neurônios nociceptivos primários pelas prostaglandinas depende da ativação de receptores neuronais de IL-1 $\beta$  nos terminais periféricos os quais, por sua vez, induzem a liberação de IL-1 $\beta$  no gânglio da raiz dorsal, atuando como neuromodulador da via de liberação de PGs pelas células neuronais (LAZAROV, 2002; ARALDI, 2012).

Neeb et al. (2011) investigaram a expressão de COX e suas fontes celulares em células cultivadas do gânglio trigeminal de ratos estimuladas com a citocina IL-1 $\beta$ . Nesse estudo foi constatado que a IL-1 $\beta$  ativa os neurônios e as células gliais satélites no gânglio trigeminal levando a uma expressão elevada da enzima COX-2 nestas células e,

consequentemente, um aumento na produção de  $PGE_2$  que, por sua vez, ativa os neurônios trigeminais para liberação de peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) causando a dor (TAKEDA et al., 2007).

Em contraste com nossos achados, Figueiredo et al. (2010) demonstraram que o efeito anti-hipernociceptivo da lectina da alga marinha vermelha *H. cervicornis*, na hipernocicepção inflamatória induzida por carragenana, ovalbumina e prostaglandinas  $E_2$  na pata de ratos, não está relacionado com a supressão da produção de citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , estando associado a redução da migração neutrofílica e também ao aumento da produção de óxido nítrico.

Satoh et al. (2009) mostraram que, após a indução de sinovite na ATM com IL-1 $\beta$ , fibroblastos-símile expressaram vários mediadores inflamatórios, demonstrando que a interação dessa citocina com os fibroblastos sinoviais, deve ser considerada importante na progressão da inflamação na ATM.

Wang et al. (2011) induziram a artrite por colágeno na pata de ratos. No início da artrite os animais foram tratados diariamente com a administração oral do extrato etanólico de *Caesalpinia sappan* (EHCS) durante 10 dias. Esse tratamento foi capaz de suprimir a superprodução das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  no soro de ratos, sugerindo a eficácia do referido extrato na artrite reumatoide e em outras doenças artríticas.

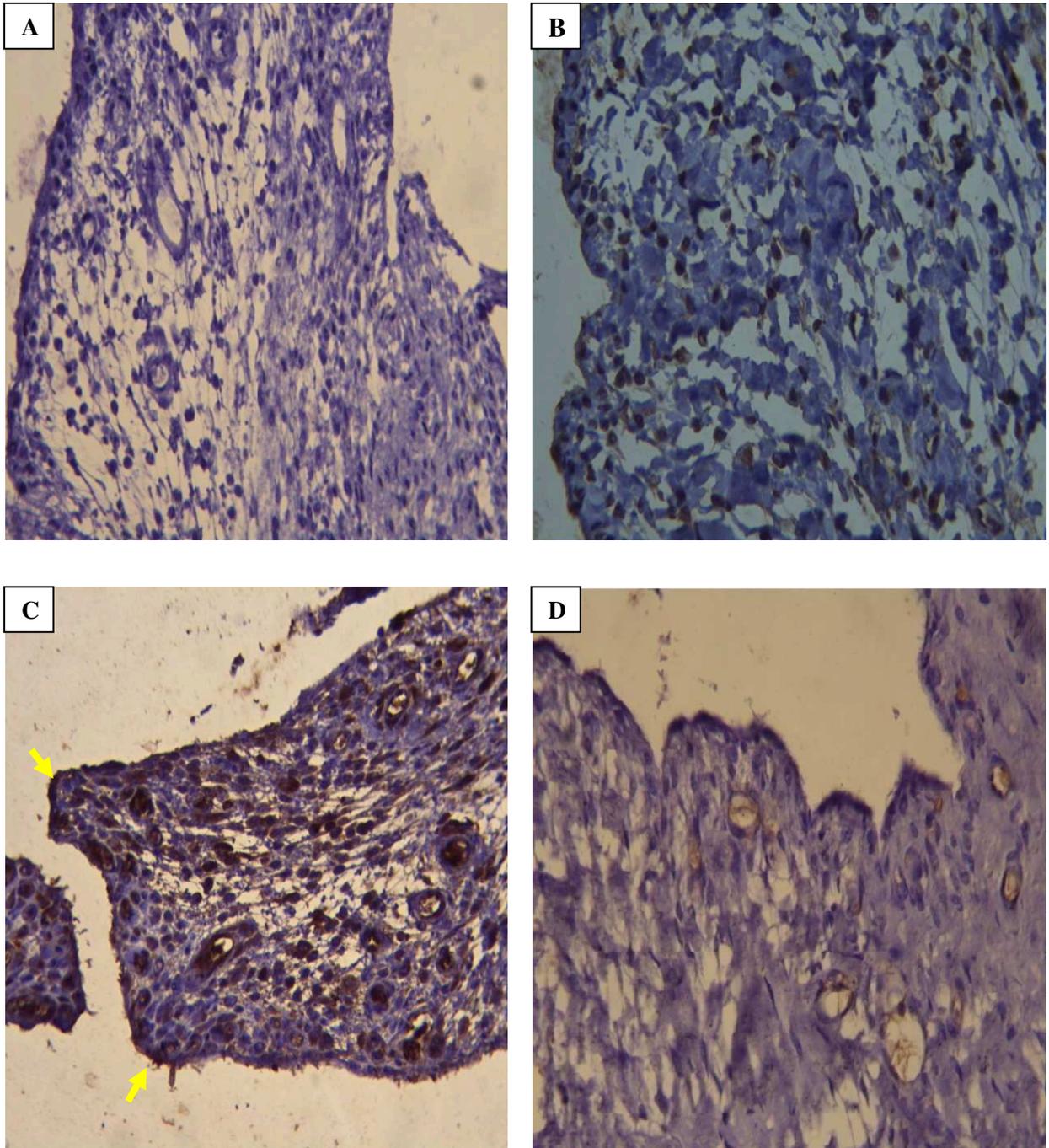
#### 4.2.3 Imunohistoquímica para IL-1 $\beta$ e TNF- $\alpha$

A análise imunohistoquímica para IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  apresentou um aumento na imunexpressão dessas citocinas, a qual foi caracterizada pela marcação de células com cor acastanhada nos tecidos da ATM de ratos com artrite induzida por injeção intra-articular de Zy, quando comparado com o grupo Sham, que revelou apenas uma expressão discreta de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ . Nós observamos que os tipos celulares que predominantemente expressaram IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  foram as células sinoviais (sinoviócitos). As secções do grupo controle negativo foram feitas em tecidos de ratos com artrite na ATM injetados com Zy na ausência dos anticorpos anti-TNF- $\alpha$  e anti-IL-1 $\beta$ .

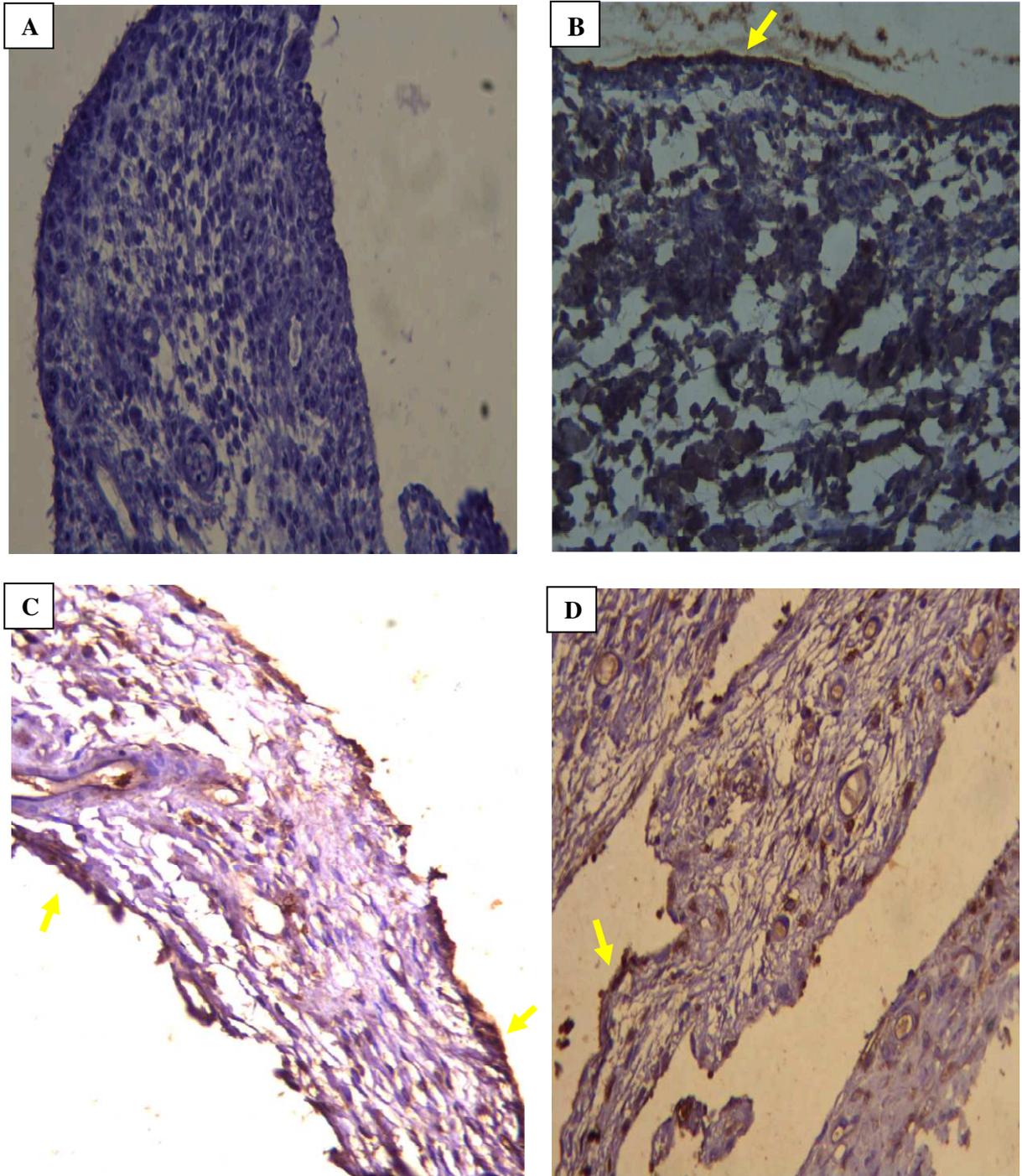
Ao avaliarmos o grupo tratado com LCc (10 mg/kg; i.v.) foi observado uma diminuição significativa na expressão de TNF- $\alpha$  (**Figura 14**), comparado com o grupo Zy, fato também observado para a imunomarcação de IL-1 $\beta$ , que foi inibida pelo tratamento com LCc, apresentando padrão semelhante ao Sham (**Figura 15**). Este perfil sugere uma resposta imuno celular da LCc durante a fase aguda, já que os níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  estão associados com processos inflamatórios severos.

A discreta expressão observada para a IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  no grupo Sham pode ser justificada por uma possível lesão provocada pela injeção intra-articular. Paiva et al. (2011) também observaram uma baixa expressão de TNF- $\alpha$  para o grupo salina, na imunohistoquímica da articulação do joelho.

**Figura 14- Fotomicrografias da Membrana Sinovial da ATM de Ratos com Artrite Induzida por Zy após Análise de Imunohistoquímica para o TNF- $\alpha$ .** (A) controle negativo (seções na ausência de anticorpos anti-TNF- $\alpha$ ) de ratos com artrite (400x). (B) membrana sinovial do grupo Sham mostrou discreta expressão de TNF- $\alpha$  (C) membrana sinovial do grupo Zy (2 mg/art., 40  $\mu$ L) com reação intensa para TNF- $\alpha$  (400x). (D) membrana sinovial de grupo de animais tratados com LCc (10 mg/kg, i.v.), não mostrando reação de TNF- $\alpha$ , após a artrite induzida por Zy (400x). Setas amarelas indicam sinoviócitos.



**Figura 15- Fotomicrografias da Membrana Sinovial da ATM de Ratos com Artrite Induzida por Zy**  
**Análise de Imunohistoquímica para o IL-1 $\beta$ .** (A) controle negativo (seções na ausência de anticorpos anti-IL-1 $\beta$ ) de ratos com artrite (400x). (B) membrana sinovial do grupo Sham mostrou discreta expressão de IL-1 $\beta$  (C) membrana sinovial do grupo Zy (2 mg/art. 40  $\mu$ L) com reação intensa para IL-1 $\beta$  (400x). (D) membrana sinovial de grupo de animais tratados com LCc (10 mg/kg, i.v.), mostrou discreta expressão de IL-1 $\beta$  após a artrite induzida por Zy (400x). Setas amarelas indicam sinoviócitos.



Os resultados de inibição na imunoexpressão da IL-1 $\beta$  após tratamento com LCc corroboram com os resultados observados nesse estudo durante a dosagem dessa mesma citocina no tecido periarticular da ATM de animais com artrite, em que também foi demonstrado efeito inibitório da lectina estudada sobre a produção de IL-1 $\beta$ . Além disso, foi observado por imunohistoquímica a redução de TNF- $\alpha$ , fato que nos faz inferir que os efeitos anti-inflamatório e antinociceptivo da LCc podem estar atrelados à inibição da liberação de agentes pró-inflamatórios.

Em concordância com os nossos resultados Queiroz (2013) também demonstrou que a referida lectina foi capaz de reduzir a expressão de IL-1 $\beta$  no edema de pata induzido por carragenana, promovendo uma fraca marcação em fibrócito, neutrófilo e ceratinócito, evidenciando, assim, sua ação anti-inflamatória.

Além disso, o efeito anti-inflamatório dessa lectina foi confirmado em um estudo realizado por Abreu et al. (2012), no qual LCc induziu em cultura de células esplênicas de camundongo BALBc (*in vitro*) níveis elevados da IL-10, principal citocina reguladora na resposta anti-inflamatória.

Após análise imunohistoquímica, Paiva et al. (2011) obtiveram dados semelhantes aos nossos, onde foi observado que o tratamento com polissacarídeos sulfatados da alga *L. variegata* provocou uma redução da expressão de TNF- $\alpha$  na artrite induzida por Zy na articulação do joelho de ratos.

O tratamento com Curcumina, componente importante da planta açafrão-da-terra, a partir do 21º dia após a indução da artrite por imunização com colágeno tipo II, administrado em dose diária por duas semanas promoveu *down-regulation* no quadro clínico da artrite e nos níveis de expressão de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (MOON et al., 2010).

O desenvolvimento da hipernocicepção inflamatória tem a participação fundamental de algumas citocinas pró-inflamatórias, entre elas estão a IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ . A IL-1 $\beta$  é um agente hipernociceptivo extremamente potente e atua periféricamente (FERREIRA et al., 1988; CUNHA et al., 2005). O TNF- $\alpha$ , por sua vez, tem um potencial papel patogênico no desenvolvimento da sinovite na artrite, na formação do *pannus* reumatoide e no processo de destruição da articulação, uma vez que aumenta a proliferação de sinoviócitos processo de destruição da articulação (CAMUSSI & LUPIA, 1998). Além disso, desencadeia uma cascata de mediadores secundários envolvidos no recrutamento de células inflamatórias, com a indução da liberação de IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8, estimulando ainda a produção de mediadores simpatomiméticos (CUNHA et al., 1992; CUNHA et al., 2005). Estudos anteriores

demonstraram que a inibição da produção de TNF- $\alpha$  em animais com artrite produz efeito antinociceptivo (GONDIM et al., 2012; VALE et al., 2006).

Muitas pesquisas têm revelado que a citocina inflamatória TNF- $\alpha$  está implicada na modulação de processos dolorosos, através da habilidade de promover a sensibilização de nociceptores e mediar uma ligação entre os sistemas nervoso e imune (KIDD et al., 2004).

Vários autores relataram que as concentrações de mediadores pró-inflamatórios, como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , são elevadas no fluido sinovial de pacientes com DTM, sugerindo que estas citocinas podem estar envolvidas na patogênese destas desordens (KIM et al., 2012; KANEYAMA et al., 2002; SUZUKI et al., 2002). Portanto, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  são consideradas citocinas importantes por estarem envolvidas em algumas patologias da ATM (KE et al., 2007), induzindo a produção de metaloproteinases que degradam irreversivelmente componentes da matriz extracelular (KOSTRZEWA-JANICKA et al., 2012; SUZUKI et al., 2002), incluindo a cartilagem articular, além de atuar na destruição óssea e na proliferação celular.

Elevado níveis de IL-1 $\beta$  em fluido sinovial de pacientes com DTM pode ter células sinoviais e endoteliais como a sua principal fonte celular (SUZUKI et al., 1999). Concentrações significativas elevadas de IL-1 $\beta$  foram observadas no líquido sinovial de ATM apresentando imagens radiográficas com alterações ósseas degenerativas, onde os níveis de IL-1 $\beta$  estão associados com a extensão da erosão radiográfica encontrada na ATM (KUBOTA et al., 1999).

Pesquisas revelam o importante papel de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no processo de migração neutrofílica através do aumento das moléculas de adesão na superfície endotelial, sendo estas citocinas necessárias para o correto endereçamento dos neutrófilos (KELLY; HWANG; KUBES, 2007; CANETTI et al., 2001; SAUNDERS et al., 2005).

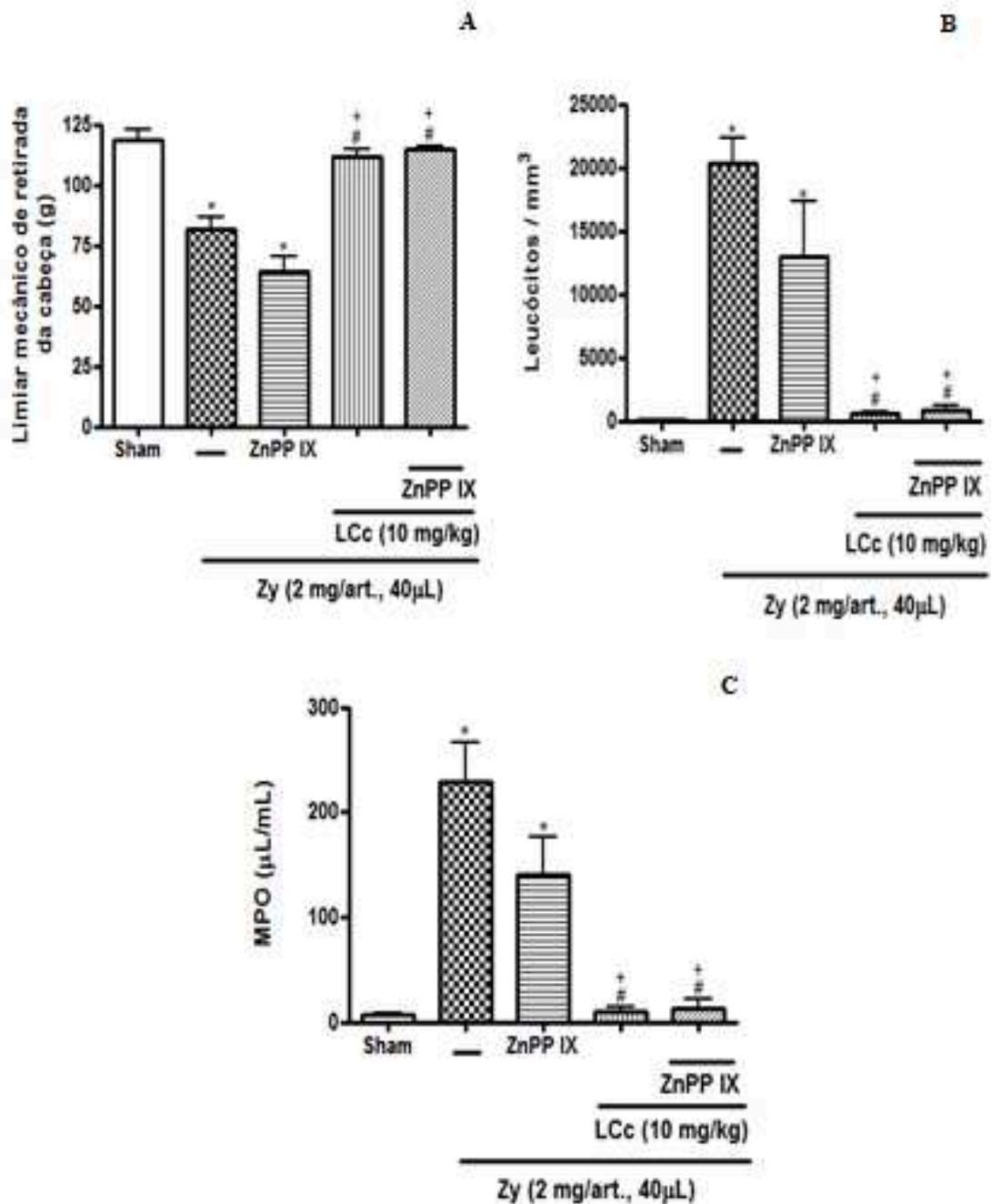
Nesse trabalho foi mostrado que o pré-tratamento dos animais com LCc diminuiu significativamente a migração de neutrófilos induzida por Zy no lavado sinovial. Esta avaliação foi realizada de forma indireta através da quantificação da MPO. Desta forma, podemos sugerir que a LCc causa diminuição do influxo leucocitário provavelmente por está interferindo na interação leucócito-endotélio através da diminuição de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , uma vez que estes mediadores atuam induzindo a expressão de moléculas de adesão, aumentando a avidéz de ligação e promovendo quimiotaxia. Vale salientar, que a diminuição local da concentração destas citocinas também está diretamente relacionada com a redução da síntese de prostaglandinas e aminas simpáticas que sensibilizam diretamente os nociceptores diminuindo o quadro doloroso causado por Zy (CUNHA et al., 2005 ; CUNHA et al., 1992).

O potencial terapêutico de drogas que atuam como alvo da interação leucócitos-endotélio ou que visam especificamente inibir as citocinas pró-inflamatórias consiste na intervenção farmacológica mais promissora para o controle de perda óssea articular e tem sido muito bem sucedido no tratamento de doenças inflamatórias como artrite (GUNSON et al., 2012). O desenvolvimento de drogas seguras e efetivas que possuam como alvo esses componentes moleculares envolvidos no rolamento e adesão dos leucócitos na resposta inflamatória pode gerar um novo campo, com terapias melhoradas para as desordens associadas com a inflamação (PANÉS; PERRY; GRANGER, 1999). Assim, drogas que inibem a produção de citocinas ou atenuam diretamente a interação leucócito-endotélio são importantes ferramentas anti-inflamatórias e conseqüentemente analgésicas.

#### **4.3 Avaliação do Envolvimento da Via da HO-1 nas Atividades Antinociceptiva e Anti-inflamatória da LCc**

Para investigar o possível papel na via da HO-1 dos efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório da LCc (10 mg/kg, i.v.), os ratos foram pré-tratados (s.c.) com ZnPP IX (3 mg/kg), um inibidor específico da HO-1, resultando na inibição desta via. No entanto, nos ensaios de nocicepção e inflamação, na presença de ZnPP IX, os efeitos antinociceptivo e anti-inflamatória da LCc (10 mg/kg, i.v.) sobre a artrite induzida por Zy na ATM de ratos não foram inibidos (**Figura 16 A, B**). Esses resultados foram confirmados pela atividade da MPO (**Figura 16 C**).

**Figura 16- Efeito de LCc no Ensaio da Via da HO-1 com ZnPP-IX na Hipernocicepção Mecânica (A), o Influxo de Leucócitos (B) e a Atividade de MPO (C) na Artrite Induzida por Zy. . Zy (2 mg/art., 40 uL), ou solução salina 0,9 % foram injetados i.art. na ATM esquerda dos ratos. ZnPP IX ou solução salina foram administrados (s.c.) previamente à LCc ( 10 mg/kg, i.v.). Os dados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. de seis animais de cada grupo (ANOVA, Teste de Bonferroni). \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo sham. #  $p < 0,05$  em relação ao grupo Zy. +  $p < 0,05$  em relação ao grupo ZnPP IX.**



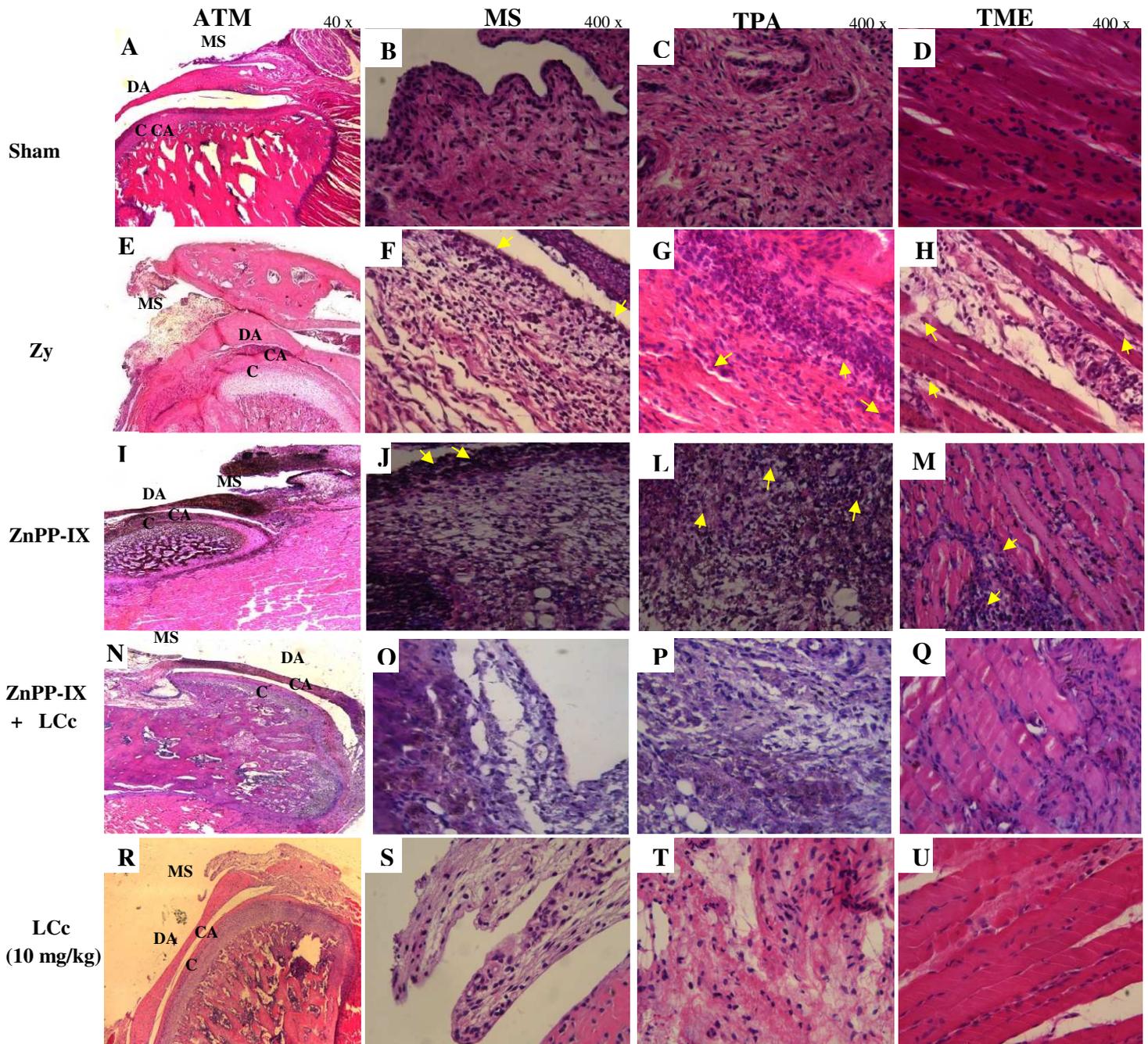
A não participação da via da HO-1 no efeito anti-inflamatório da LCc foi também comprovado pelas análises histológicas e imunohistoquímicas para HO-1. A **Tabela 2** mostra os pontos atribuídos para análise histológica da ATM e compara os valores entre os grupos: Sham, Zy, ZnPP IX (3 mg/kg) e ZnPP IX (3 mg/kg) associado com LCc (10 mg/kg, i.v.), tratado com LCc (10 mg/kg, i.v.). Os resultados da referida análise mostraram que LCc reduziu ( $p < 0,05$ ) os parâmetros inflamatórios para um estado normal, apresentando um influxo baixo de células inflamatórias na membrana sinovial, nos tecidos periarticular e muscular, em comparação com o grupo de Zy. Com relação ao grupo tratado com ZnPP IX, o processo inflamatório foi mantido de moderado a grave, na membrana sinovial e no tecido periarticular, enquanto que, no tecido muscular esquelético o processo inflamatório foi considerado moderado, assemelhando-se ao grupo Zy. O grupo tratado com ZnPP IX + LCc houve uma redução do influxo de células inflamatórias na membrana sinovial, nos tecidos periarticulares e musculares, se assemelhando ao grupo LCc quando administrada isoladamente. Estes dados podem ser vistos através das fotomicrografias da ATM (**Figura 17**).

**Tabela 2- Análise Histológica da ATM de Ratos com Artrite Induzida por Zy quando Pré-tratados com ZnPP IX e LCc.** \* $p < 0,05$  em relação ao grupo sham, #  $p < 0,05$  em relação ao grupo Zy. (Kruskal-Wallis, Dunn's).

<b>Grupos</b>	<b>Inf. Cel.Mem. Sinovial</b>	<b>Inf. Cel. Tec. Periarticular</b>	<b>Inf. Cel. Tec. Muscular</b>
Sham	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
Zy	4 (3-4)*	4 (3-4)*	3(2-3)*
ZnPP IX	3 (1-3)*	4 (2-4)*	2 (1-3)*
ZnPP IX + LCc 10	1(1-1) #	1(1-1) #	2 (0-2)
LCc 10	0 (0-0) #	1(1-1) #	0 (0-2) #

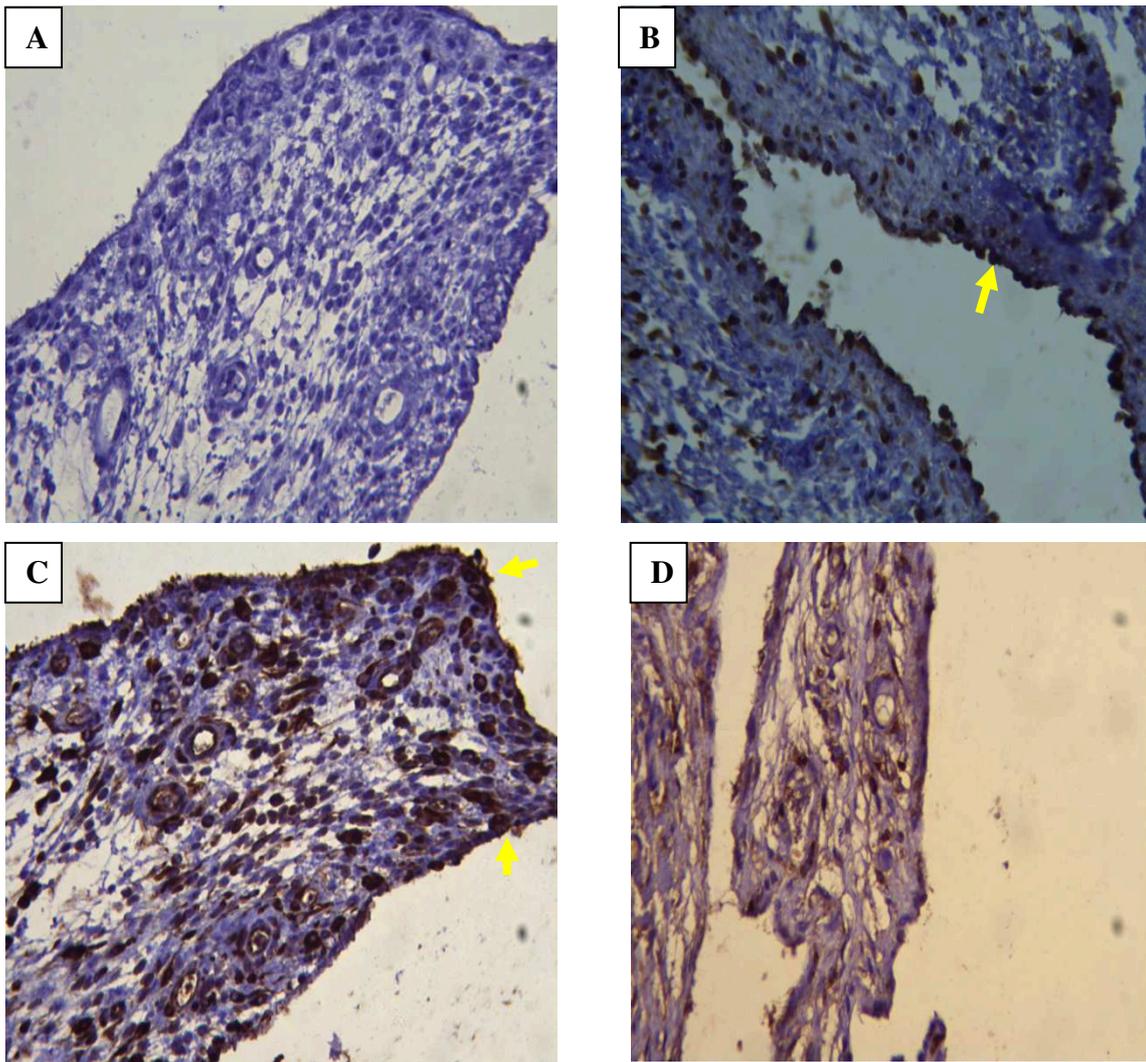
0- ausência; 1- discreto; 2- leve; 3-moderado e 4- intenso.

**Figura 17- Fotomicrografias da Análise Histológica da ATM de Ratos com Artrite Induzida por Zy quando pré-tratados ZnPP IX e LCc.** (A) ATM grupo Sham (40 x) (B, C e D) Membrana sinovial, tecido periarticular e tecido muscular esquelético do grupo Sham sem influxo celular (400 x), respectivamente. (E) ATM do grupo Zy (2mg/art., 40 µL) (40 x). (F, G e H) Membrana sinovial, tecido periarticular e tecido muscular do grupo Zy com influxo celular intenso (400 x), respectivamente. (I) ATM do grupo ZnPP IX (40 x). (J, L e M) Membrana sinovial, tecido periarticular e tecido muscular do grupo tratado com ZnPP-IX com intenso influxo celular (400 x), respectivamente. (N) ATM do grupo ZnPP IX + LCc (40 x). (O, P e Q) Membrana sinovial, tecido periarticular e tecido muscular do grupo tratado com ZnPP IX + LCc com discreto influxo celular (400 x), respectivamente. (R) ATM do grupo LCc (10 mg/kg, i.v.) (40 x). (S, T e U) Membrana sinovial, tecido periarticular e tecido muscular do grupo tratado com LCc 10 mg/kg sem infiltrado celular (400 x) respectivamente C: côndilo; CA: artilagem articular; DA: disco articular; MS: membrana sinovial; TPA: Tecido periarticular; TME: tecido muscular esquelético. Coloração de hematoxilina e eosina. Setas amarelas indicam neutrófilos.



Em relação à análise imunohistoquímica, foi verificada uma expressão intensa de HO-1 em células sinoviais da membrana sinovial da ATM de ratos com artrite induzida por Zy, caracterizada pela marcação de células de cor acastanhada. A expressão de HO-1 em células sinoviais foi significativamente diminuída pelo pré-tratamento dos animais com LCc (10 mg/kg; i.v.) em comparação ao grupo Zy. Além disso, observou-se uma expressão de níveis constitutivos basais para HO-1 em células sinoviais no grupo Sham. As seções do grupo controle negativo foram feitas em tecidos de ratos com artrite na ATM induzida por Zy na ausência da adição do anticorpo anti-HO-1(Figura 18).

**Figura 18- Fotomicrografias da Membrana Sinovial da ATM de Ratos com Artrite Induzida por Zy durante Análise de Imunohistoquímica para HO-1.** (A) Controle negativo (seções na ausência de anticorpos anti-HO-1) de ratos com artrite (400x). (B) membrana sinovial do grupo Sham revelou expressão de constitutivos basal de HO-1 (400x). (C) membrana sinovial do grupo Zy (2 mg/art., 40 µL) com intensa expressão de HO-1 (400x). (D) membrana sinovial de grupo de animais tratados com LCc (10 mg/kg, i.v.) + mostrou uma discreta expressão de HO-1 na membrana sinovial após artrite induzida por Zy (400x). Setas amarelas indicam sinoviócitos.



Esses resultados revelam que as ações antinociceptiva e anti-inflamatória da LCc não depende da integridade da via da HO-1, uma vez que seus efeitos não foram alterados pela administração de ZnPP IX. Esses dados foram comprovados através da análise histológica, na qual o grupo ZnPP IX + LCc diminuiu o influxo celular, com resultado semelhante ao grupo tratado somente com LCc e por imunohistoquímica, em que o grupo LCc revelou um nível de expressão de HO-1 inferior aos níveis constitutivos de expressão da HO-1 para o grupo Sham. Portanto, LCc não atua ativando HO-1.

A hemoxigenase-1 é uma proteína sensível ao estresse produzido por vários agentes oxidantes. A sua expressão, em resposta a diferentes mediadores inflamatórios, pode contribuir para reduzir a inflamação, assim como seus eventos clássicos, por exemplo, edema, adesão e migração de leucócitos, além de possuir efeitos protetores contra injúrias oxidativas em vários órgãos (GRANGEIRO et al., 2011; ALCARAZ; FERNÁNDEZ; GUILLÉN, 2003). Diversos estudos demonstraram que a HO-1 e seus metabólitos monóxido de carbono (CO) e biliverdina (BVD), são capazes de modular o processo inflamatório (DOI et al., 1999; YACHIE et al., 2003).

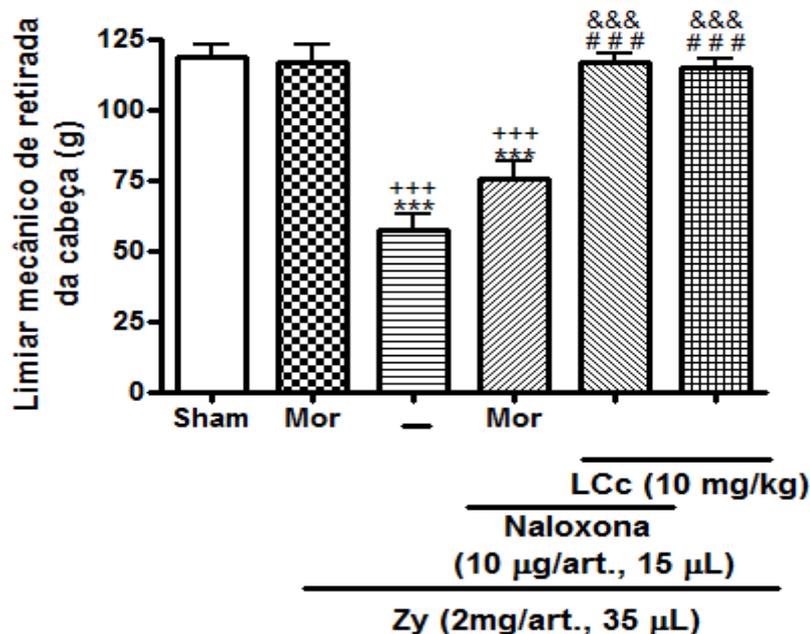
Ao contrário dos nossos achados, alguns trabalhos têm demonstrado a participação da via da HO-1 na ação antinociceptiva e anti-inflamatória de alguns compostos (GRANGEIRO et al., 2011; VANDERLEI et al., 2011; VICENTE et al., 2003). Nesse sentido, o efeito antinociceptivo de extratos etanólico da planta *T. toxicaria* foi revertido pela administração ZnPP IX, no modelo de artrite induzida por Zy na ATM de ratos (VAL, 2012).

Abreu (2012) mostrou que a lectina da alga marinha vermelha *S. filiformes* teve sua capacidade anti-inflamatória reduzida quando os animais foram tratados com ZnPP IX, no modelo de edema de pata induzido por carragenana. Em concordância, Vanderlei et al. (2011) demonstraram que o pré-tratamento com ZnPP IX reverteu a atividade anti-inflamatória do polissacarídeo sulfatado da alga *Gracilaria birdiae*.

#### 4.4 Análise da Participação dos Receptores Opioides Periféricos no Efeito Antinociceptivo da LCc

Para investigar a possível participação do sistema opioide periférico na ação antinociceptiva da LCc, animais foram pre-tratados com naloxona (10 µg/art., 15 µL), 5 min antes da administração da LCc (10 mg/kg, i.v.). A presença de naloxona não alterou a resposta antinociceptiva dessa lectina na artrite induzida por Zy na ATM de ratos. No entanto, nessa dose, a naloxona bloqueou a ação antinociceptiva ( $p < 0,001$ ) da morfina (5 mg/kg, s.c.) (Figura 19).

**Figura 19- Avaliação do Envolvimento dos Receptores Opioides Periféricos no Efeito Antinociceptivo de LCc na Hipernociceção Mecânica Induzida por Zy na ATM de Ratos.** Zy (2 mg/art., 40 µL) ou salina 0.9% foram injetados i.art. na ATM esquerda de ratos. Animais receberam s.c. salina ou LCc (10 mg/kg, i.v) com ou sem naloxona (10 µg/art., 15 µL) e morfina (5 mg/kg, s.c.) com ou sem naloxona. Dados são expressos como média ± E.P.M de 6 animais para cada grupo (ANOVA, teste de Bonferroni). \*\*\*  $p < 0.001$  indica diferença significativa em relação ao grupo Sham. ###  $p < 0.001$  indica diferença significativa em relação ao grupo Zy. +++  $p < 0.001$  indica diferença significativa em relação ao grupo morfina. &&&  $p < 0.001$  indica diferença significativa do grupo morfina com naloxona.



Diversos mecanismos parecem contribuir para a analgesia periférica mediada pelo sistema opioide durante o processo inflamatório, incluindo aumento da síntese e de transporte de receptores opioides para a periferia (JI et al., 1995), ativação da proteína G (ZOLLNER et al., 2003) aumentando a entrada do íon  $Ca^{+2}$  e liberação do  $Ca^{+2}$  intracelular via ativação de fosfolipase C (CHAN et al., 2000). Fontes endógenas de peptídeos opioides endógenos foram

identificadas em células do sistema imunológico, como macrófagos, mastócitos e linfócitos (BRACK et al., 2004), onde a liberação local desses opioides pode ser estimulada por um evento estressante e é mediada por uma variedade de hormônios, como o fator liberador de corticotrofina (CRF) e citocinas, como TNF- $\alpha$  e IL-1 (SCHÄFER et al., 1994), bem como pela ativação simpática (BINDER et al., 2004).

Opioides endógenos são praticamente indetectáveis na periferia, porém na presença de uma reação inflamatória aguda, beta endorfina, met-enkefalina e dinorfina têm sido encontrados em tecidos inflamados, nos estágios iniciais do processo inflamatório (até a sexta hora). Os sistemas opioides, central e periférico, são então ativados para inibir o processo nociceptivo. Nos estágios mais tardios (no quarto dia), a antinocicepção é mediada por  $\beta$  endorfina liberada por leucócitos, atuando em receptores  $\mu$  e  $\delta$  periféricos (CABOT et al., 2001).

Nossos resultados mostraram que a resposta antinociceptiva da LCc não foi revertida por naloxona, um antagonista não seletivo dos receptores opioides, neste modelo experimental, sugerindo que o efeito antinociceptivo de LCc não ocorre pelo mecanismo opioide periférico. De acordo com Vanderlei et al. (2010), a resposta antinociceptiva da LCc, em modelos clássicos de nocicepção em camundongos, ocorreu predominantemente através do mecanismo periférico, embora não tenha sido descartado uma possível atuação central. Nesse sentido, podemos sugerir, com base nesses dados, que a LCc atua periféricamente, mas não através dos receptores opioides. Novas investigações devem ser feitas no intuito de elucidar o mecanismos de ação antinociceptivo da LCc.

Fávaro-Moreira et al. (2009) mostraram que o antagonista de receptores opioides naloxona não afeta o efeito antinociceptivo do estradiol, sugerindo que esse efeito é independente do mecanismo opioide periférico, no modelo de dor induzida por formalina na ATM de ratos.

Estudo recente, realizado por Júnior et al. (2012), demonstrou que o polissacarídeo sulfatado total extraído da alga marinha *Gracilaria caudata* apresenta efeito antinociceptivo sobre a hipernocicepção mecânica induzida por carragenana na pata de camundongos. Esse efeito é mediado pela ativação da via NO/cGMP/PKG seguida da abertura dos canais de  $K_{ATP}$  e dependente da ação dos opioides endógenos periféricos.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A lectina da alga marinha verde *Caulerpa cupressoides* (LCc), purificada por cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose, apresenta dois picos, sendo que o segundo pico possui atividade hemaglutinante.

A LCc apresenta efeito antinociceptivo no modelo de artrite induzida por Zy na ATM de ratos reduzindo a hipernocicepção mecânica. Seu efeito antinociceptivo mostrou-se independente do mecanismo opiodes periférico.

A LCc apresenta efeito anti-inflamatório no modelo de artrite induzida por Zy na ATM de ratos, reduzindo o infiltrado celular inflamatório e a atividade da MPO no lavado sinovial. Seu mecanismo de ação pode está relacionado com a redução da produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ .

Além disso, a via HO-1 não participa do efeito antinociceptivo e anti-inflamatório da LCc.

## 6 CONCLUSÃO

A lectina da alga marinha verde *Caulerpa cupressoides* (LCc) apresentou efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório no modelo de artrite induzida por Zy na ATM de ratos. O mecanismo de ação de LCc pode está relacionado com a redução da produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ .

## REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, N.; KAPPAS, G. Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase **Pharm. Rev.** v. 60, p.79–127, 2008.
- ABRAMSON, S. B.; AMIN, A.R.; CLANCY, R.M.; ATTUR, M. The role of nitric oxide in tissue destruction. **Best. Pra. & Res. Clin. Rheuma.** v. 15, n.5, p. 831-845, 2001.
- ABREU, T. M.; SILVA, L. M. C. M.; VANDERLEI, E. S. O.; MELO, C.M.L.; PEREIRA, V.R A.; BENEVIDES, N.M. B. Cytokine Production Induced by Marine Algae Lectins in BALB/c Mice Splenocytes. **Prot. & Pep. Lett.** v. 19, n. 9, p. 975-981, 2012.
- ABREU, T. M. **EFEITOS DA LECTINA DA ALGA MARINHA VERMELHA *Solieria filiformes* (KÜTZING) P.W. GABRIELSON NA NOCICEPÇÃO E INFLAMAÇÃO EM ANIMAIS.** 2012. 113 fls. Mestrado (mestrado em Bioquímica). Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Ceará, 2012.
- AIKEN, A.; BOULOUX, G.; HUDGINS, P. MR Imaging of the Temporomandibular Joint. **Magn. Reson. Imag. Clin. N. Am.** v. 20, p. 397–412, 2012.
- AINOUZ, I.L.; SAMPAIO, A.H. Screening of Brazilian marine algae for hemagglutinins. **Bot. Marina.** v.34, p. 211-214, 1991.
- AINOUZ, I.L. SAMPAIO, A.H.; BENEVIDES, N.M.B.; FREITAS, A.L.P.; COSTA, F.H.F.; CARVALHO, M.R.; PINHEIRO-JOVENTINO, F. Agglutination of enzyme treated erythrocytes by brazilian marine algal extracts. **Bot. Marina.** v. 35, p. 475-479, 1992.
- AINOUZ, I.L.; SAMPAIO, A.H.; FREITAS, A.L.P.; BENEVIDES, N.M.B.; MAPURUNGA, S. Comparative study on hemagglutinins from the red algae *Bryothamnion seaforthii* and *Bryothamnion triquetrum*, **Rev. Bras. de Fisi.Veg.**, v. 7, p. 15-19, 1995.
- AJUEBOR, M. N.; VIGÁG, L.; FLOWER, R. J.; PERRETTI, M.; SZABO, C. Role of inducible nitric oxide synthase in the regulation of neutrophil migration in zymosan induced inflammation. **Immunol.** v.95, p. 625-630, 1998.
- ALCARAZ, M.J.; FERNANDEZ, P.; GUILLEN, M.I. Anti-inflammatory actions of the heme oxygenase-1 pathway. **Curr. Pharm. Desig.** v. 9, p. 2541–2551, 2003.
- ALOMAR, X.; MEDRANO, J.; CABRATOSA, J.; CLAVERO, J.A. ; LORENTE, M.; SERRA, I.; MONILL, J.M.; SALVADOR, A. Anatomy of the temporomandibular joint. **Sem. in Ultra., CT, and MRI.** v.28 n.3 p.170-183, 2007.
- ALSTERGREN, P.; KOOP, S; THEODORSSON, E. Synovial fluid from the temporomandibular joint: sample quality criteria and levels of interleukin-1 $\beta$  and serotonin. **Acta Odontol. Scand.** v. 57, n.1, p. 16-22, 1999.
- ALSTERGREN, P.; BENAVENTE, C.; KOOP, S. Interleukin 1 $\beta$ , Interleukin 1 receptor antagonist, and Interleukin 1 soluble receptor II in temporomandibular joint synovial fluid from patients with chronic polyarthritides. **J. Oral Max. Surg.** v.61, n.10, p.1171-1178, 2003.

AMARO, I.F.; MACHÍN, S.; CARMONA, L.; ALVARO, I.G.; GONZÁLEZ, F.D. Pattern of use and safety of non-steroidal anti-inflammatory drugs in rheumatoid arthritis patients. A prospective analysis from clinical practice. **Reumatol. Clin.** v.5, n. 6, p.252–258, 2009.

ARALDI, D. **O papel da Interleucina-1 $\beta$  Produzida no Gânglio da Raiz Dorsal no Desenvolvimento da Hiperálgia Inflamatória.** 2012. 96 fls. Tese (doutorado em Biologia Funcional e Molecular, area de Fisiologia). Programa de Pós-Graduação em Biologia Funcional e Molecular, Universidade Estadual DE Campinas, 2012.

ARAÚJO, I.W.F. **Estudo dos efeitos de um polissacarídeo sulfatado isolado da alga marinha *Solieria filiformes* sobre os modelos de nociceção e inflamação.** 2012. 221 fls. Tese (doutorado em Biotecnologia). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia-RENORBIO- UFC, 2012.

ARDEN, N.; NEVITT, MC. Osteoarthritis: Epidemiology. **Best Prac. & Res. Cli. Rheum.** v. 20, n.1 p. 3-25, 2006.

ATSÜ, S.S.; AYHAN-ARDIC, F. Temporomandibular disorders seen in rheumatology practices: a review. **Rheum. Int.** v. 26(9), p. 781-7, 2006.

AYGÜN, D.; KAPLAN, S.; ODACI, E.; ONGER, M.E.; ALTUNKAYNAK, M.E. Toxicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs: a review of melatonin and diclofenac sodium association. **Histol. Histopathol.** v. 27, p. 417-436, 2012.

BAGIS, B.; AYAZ, E. A.; TURGUT, S.; DURKAN, R.; ÖZCAN, M. Gender difference in prevalence of signs and symptoms of temporomandibular joint disorders: a retrospective study on 243 consecutive patients. **Int. J. Med. Sci.** v. 9, p. 539-544, 2012.

BARRETTO, S.R.; DE MELO, G.C.; DOS SANTOS, J.C.; DE OLIVEIRA, M.G.B.; PEREIRA-FILHO, R.N.; ALVES, A.V.F.; RIBEIRO, M.A.G.; LIMA-VERDE, I.B.; QUINTANS JÚNIOR, L.J.; DE ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R.L.C.; BONJARDIM, L.R. Evaluation of anti-nociceptive and anti-inflammatory activity of low-level laser therapy on temporomandibular joint inflammation in rodents. **J. of Photochem. and Photobio. B: Bio.** v. 129, p. 135–142, 2013.

BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology. **CRC Press.** Taylor & Francis Group, 2006.

BARTOK, B.; FIRESTEIN, G.S. Fibroblast-like synoviocytes: Key effector cells in rheumatoid arthritis. **Immun. Rev.** v. 233, p. 233-255, 2010.

BASBAUM, A. I.; BAUTISTA, D. M.; SCHERRER, G.; JULIUS, D. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. **Cell.** v. 13, p. 267–284, 2009.

BELL, W. E. Clinical Management o temporomandibular disorders- classification, diagnosis, manegement. **Chicago: Year Book Med.**, 1982.

BENEVIDES, N.M.B.; HOLANDA, M. L.; MELO, F. R.; PEREIRA, M. G.; MONTEIRO, A. C. O.; FREITAS, A. L. P. Purification and Partial Characterization of the Lectin from the Marine Green Alga *Caulerpa cupressoides* (Vahl) C. Agardh. **Bot. Mar.** v. 44, p.17-22, 2001.

BENYHE, S. Morphine: new aspects in the study of na ancient compound. **Life Sci.** v. 55, p. 969-979, 1994.

BEZERRA, B. P. N.; RIBEIRO, A.I.A.M.; FARIAS, A.B.L.; FARIAS, A.B.L.; FONTES, L.B.C.; NASCIMENTO, S.R.; NASCIMENTO, A.S.; ADRIANO, M.S.P.F. Prevalência da disfunção temporomandibular e de diferentes níveis de ansiedade em estudantes universitários. **Rev. Dor.** p. 235-242, 2012.

BEZERRA, M. M.; BRAIN, S. D.; GREENACRE, S.; JERONIMO, S. M.; DE MELO, L. B.; KEEBLE, J.; DA ROCHA, F. A. Reactive nitrogen species scavenging, rather than nitric oxide inhibition, protects from articular cartilage damage in rat zymosan-induced arthritis. **Br. J. Pharmacol.** v. 141, n. 1, p. 172-182, 2004.

BEZERRA, M. M.; BRAIN, S. D.; GIRÃO, V. C. C.; GREENACRE, S.; KEEBLE, J.; ROCHA, F. A. C. Neutrophils-derived peroxynitrite contributes to acute hyperalgesia and cell influx in zymosan arthritis. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharm.** v. 374, n. 4, p. 265-273, 2007.

BITENCOURT, F.S.; FIGUEIREDO, J.G.; MOTA, M.R.L.; BEZERRA, C.C.R.; SILVESTRE, P.P.; VALE, M.R.; NASCIMENTO, K S.; SAMPAIO, A.H.; NAGANO, C.S.; SAKER-SAMPAIO, S.; FARIAS, W.R.L.; CAVADA, B.S.; ASSREUY, A.M.S.; ALENCAR, N.M.N. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of a mucin-binding agglutinin isolated from the red marine alga *Hypnea cervicornis*, **Naunyn-Schmiedebergs Arch. of Pharm.** v. 377, p. 139-148, 2008.

BORGES, N.F. **Vídeo-artroscopia da articulação fêmoro- tíbio-patelar de cães antes e 21 dias após secção do ligamento cruzado cranial estudo experimental.** 2006. 41 fls. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Belo Horizonte.

BINDER, W.; MOUSA, S.A.; SITTE, N.; KAISER, M.; STEIN, C.; SCHAFER, M. Sympathetic activation triggers endogenous opioid release and analgesia within peripheral inflamed tissue. **Eur. J. of Neur.** v.20, n. 1, p.92-100, 2004.

BLUNDEN G, ROGERS DJ, FARNHAM WF. Survey of British seaweeds for hemagglutinins. **Lloydia.** v.38, p.162-168, 1975.

BOYD, W.C.; ALMODOVAR, L.R.; BOYD, L.G. Agglutinins in Marine Algae for Human Erythrocytes, **Transfusion.** v. 6, p. 82-83, 1966.

BOYD, W.C.; SHAPLEIGH, E. Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). **Science.** v. 119, p. 419, 1954.

BRACK, A.; LABUZ, D.; SCHILTZ, A.; RITTNER, H.L.; MACHELSA, H.; SCHAFER, M.; RESZKA, R.; STEIN, C. Tissue monocytes/macrophages in inflammation: hyperalgesia versus opioid-mediated peripheral antinociception. **Anesthesiology.** v. 101, p. 204-211, 2004.

BRADLEY, P.P.; CHRISTENSEN, R.D.; ROTHSTEIN, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood.** v. 60, p. 618-622, 1982.

CABOT, P.J.; CARTER, L.; SCHÄFER, M.; STEIN, C. Methionine-enkephalin and dynorphin A-release from immune cells and control of inflammatory pain. **Pain**. vol. 93, n.3, p. 207-212, 2001.

CAMUSSI, G.; LUPIA, E. The future role of anti-tumour necrosis factor (TNF) products in the treatment of rheumatoid arthritis. **Drugs**. v. 55, n. 5, p. 613-20, 1998.

CANETTI, C.; SILVA, J.S.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q.; Tumour necrosis factor-alpha and leukotriene B (4) mediate the neutrophil migration in immune inflammation. **Br. Jr. Pharmacol.**, v. 134, p. 1619-1628, 2001.

CAIRNS, B. E. Pathophysiology of TMD pain – basic mechanisms and their implications for pharmacotherapy. **J. of Oral Reha.** v. 37, p. 391–410, 2010.

CARDOSO, M.L.; XAVIER, C.A.; BEZERRA, M.E.B.; PAIVA, A.A.; CARVALHO, M.G.F.; BENEVIDES, N.M.B.; ROCHA, F.A.C.; LEITE, E.B. Assessment of zymosan-induced leucocytes influx in a rat model using sulfated polysaccharides. **Plant Med.** v. 75, p. 1-7, 2009.

CARON, J.P. Osteoarthritis. In: ROSS, M.W.; DYSON, S.J. Diagnosis and management of lameness in the horse. **Philad.: Saund. Com.** p. 572-594, 2003.

CARRARA, S.V.; CONTI, P.C. BARBOSA, J.S. Termo do 1º Consenso em Disfunção temporomandibular e Dor Orofacial. **Dental Press J. Orthod.** V. 15, n. 3, p. 114-120.

CARVALHO, L.R.; ROQUE, N. F. Fenóis halogenados e/ou sulfatados de macroalgas marinhas. **Química Nova**. v. 23, p. 757-764, 2000.

CAVADA, B. S.; BARBOSA, T.; ARRUDA, S.; GRANGEIRO, T.B. Barral-Netto M. Revisiting proteus: Do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of the Diocleinae subtribe lectins. **Current Prot. and Pept. Sci.** v. 2, p. 123-135, 2001.

CHAN, J. S.; LEE, J.W.; HO, M.K.; WONG, Y. H. Preactivation permits subsequent stimulation of phospholipase C by G(i)-coupled receptors. **Mol. Pharm.** v. 57, n.4, p. 700-708, 2000.

CHAVES, H. V.; LEITÃO, A.K.A.; FARRAPO, A.R.; RIBEIRO, R.A.; BRITO, C.G.A. Papel de mediadores inflamatórios na dor, na inflamação e em processos degenerativos da articulação temporomandibular. **JBA**. v. 5, n. 18, p. 76-84, 2005.

CHAVES, H.V. **Padronização de modelo experimental de artrite na articulação temporomandibular de ratos induzida por zymosan e estudo do papel do óxido nítrico.** 2006. 124 fls. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

CHAVES, H.V.; RIBEIRO, R.A.; SOUZA, A.M.B.; SILVA, A.A.R.; GOMES, A.S.; VALE, M.L.; BEZERRA, M.M.; BRITO, G.A.C. Experimental model of zymosan-induced arthritis in the rat temporomandibular joint: role of nitric oxide and neutrophils. **J. Biomed. Biotechnol.** v. 2011, p. 1-11, 2011.

CHAVES, H. V. **Avaliação do papel da via hemeoxigenase-1/ biliverdina/ CO no modelo experimental de dor facial e de artrite induzida por zymosan na articulação temporomandibular de ratos.** 2012. Tese (doutorado em Ciências Médicas). Programa de Pós Graduação em Ciências Médicas, Universidade Federal do Ceará, 2012.

CHILES, T.C.; BIRD, K.T. A comparative study of animal erythrocyte agglutinins from marine algae. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 94, p. 107-111, 1989.

COATES, N. J.; MCCOLL, S. R. Production of chemokines in vivo in response to microbial stimulation. **J. Immunol.**, v. 166, n. 8, p. 5176-5182, 2001.

COSTA, F.H.F.; SAMPAIO, A.H.; NEVES, S.A.; ROCHA, M. L. A. ; BENEVIDES, N. M. B.; AINOZ, I.L. Purification and characterization of a lectin from the red marine alga *Amansia multifida*. **Physiol. Mol. Bio. Plants**, v. 5, p. 53-61, 1999;

COSTEN, J. B. A syndrome of ear and sinus symptoms dependent upon disturbed function of the temporomandibular joint. **Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.**, v. 43, n. 1, p. 1-15, 1934.

CRAANE, B.; DIJKSTRA, P.U.; STAPPAERTS, K.; DE LAAT, A. Randomized Controlled Trial on Physical Therapy for TMJ Closed Lock. **J. Dent Res.** v. 91(4), p.364-369, 2012.

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

CUNHA TM, VERRI WA JR, SILVA JS, POOLE S, CUNHA FQ, FERREIRA SH. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v. 102, p.1755-1760, 2005.

CUNHA, T.M. ; TALBOT, J.; PINTO, L.G.; VIEIRA, S.M.; SOUZA, G.R.; GUERRERO, A. T.; SONEGO, F.; VERRI JR, W.A.; ZAMBONI, D.S.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. Caspase-1 is involved in the genesis of inflammatory hypernociception by contributing to peripheral IL-1 $\beta$  maturation. **Mol. Pain.** v. 6, p.63, 2010.

CURY, Y.; PICOLO, G.; GUTIERREZ, V.P.; FERREIRA, S.H. Pain and analgesia: The dual effect of nitric oxide in the nociceptive system. **Nitric Oxide.** V. 25, p. 243-254, 2011.

DAVIES, A. J.; KIM, Y. H.; OH, S. B. Painful Neuron-Microglia Interactions in the Trigeminal Sensory System. **The Open Pain J.** v. 3, p. 14-28, 2010.

DE LEEUW, R.; KLASSER, G. Orofacial Pain: Guidelines for Assessment, Diagnosis, and Management. 5<sup>a</sup> ed. **Quintessence**, 2013.

DENADAI-SOUZA, A.; CAMARGO, L.D.L.; RIBELA, M.T.C.P.; KEEBLE, J.E.; COSTA, S.K.P.; MUSCARA, M.N. Participation of peripheral tachykinin NK receptors in the carrageenan-induced inflammation of the rat temporomandibular joint. **Eur. J. Pain.** v. 13, n. 8, p. 812-819, 2009.

DENUCCI, D. J.; DIONNE, R. A; DUBNER, R. Identifying a neurobiologic basis for drug therapy in TMD's. **J. Am. Dental Assoc. Chicago.** v. 127, n. 5, p. 581-593, 1996.

DERBOCIO, A. M. ET al., The hemodynamic effects of zymosan in the perfused rat liver. **Vas. Pharm.** v. 43, p. 75-85, 2005.

DINARELLO CA. Biologic basis for Interleukin-1 in disease. **Blood.** 1996; 87: 2095-147.a

DINARELLO CA. A clinical perspective of IL-1beta as the gatekeeper of inflammation. **Eur. J. Immunol.** v. 41, p. 1203-1217, 2011b

DOI, K.; AKAIKE, T.; FUJII, S.; TANAKA, S.; IKEBE, N.; BEPPU, T.; SHIBAHARA, S.; OGAWA, M.; MAEDA, H. Induction of haem oxygenase-1 nitric oxide and ischaemia in experimental solid tumours and implications for tumour growth. **Bri. J. of Can.** v.80, p.1945-1954, 1999.

DUSSE, L.M.S.; VIEIRA, L.M.; CARVALHO, M.G. Revisão sobre óxido nítrico. **J. Bras. de Pat. e Med. Lab.** v.39, n.4, p. 343-350, 2003.

EL GAMAL, A. A. Biological importance of marine algae. **Saudi Phar. J.** v. 18, p. 1-25, 2010.

EVANS, D. E, RALSTON, S.H. Nitric oxide and bone. **J. Bone Miner Res.** v. 11, p. 300-305, 1996.

FABREGAS J, MUNOZ A, LLOVO J, ABALDE J. Agglutinins in marine red algae. **IRCS Med. Sci.** v. 12, p. 298-299, 1984.

FÁVARO-MOREIRA, N. C.; TORRES-CHÁVEZ, K. E.; FISCHER, L.; TAMBELI, C. H. Peripheral estradiol induces temporomandibular joint antinociception in rats by activating the nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate signaling pathway. **Neurosci.** v. 164, p.724-732, 2009.

FELDMAN, M.; MAINI, R. N. TNF defined as a therapeutic target for rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. **Nat. Med.** v. 9, p. 1245-1250, 2003.

FERREIRA, S. H.; LORENZETTI, B. B.; CORREA,, F. M. . Central and peripheral antialgesic action of aspirin-like drugs. **Eur. J. Pharm.** v. 53, p. 39-48, 1978.

FERREIRA, S.H.; LORENZETTI, B. B.; BRISTOW, A. F.; POOLE S. Interleukin- 1b as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue. **Nat.** v.334, p.698-700, 1988.

FIGUEIREDO, J.G.; BITENCOURT, F.S.; CUNHA, T.M.; LUZ, P.B.; NASCIMENTO, K.S.; MOTA, M.R.L.; SAMPAIO, A.H.; CAVADA, B.S.; CUNHA, F.Q.; ALENCAR, N.M.N. Agglutinin isolated from the red marine alga *Hypnea cervicornis* J. Agardh reduces inflammatory hypernociception: Involvement of nitric oxide, **Pharm., Biochem. and Beh.**, v. 96, p. 371-377, 2010.

FILIPPIN, L. I.; VERCELINO, R.; MARRONI, N. P.; XAVIER, R. M. Redox signalling and the inflammatory response in rheumatoid arthritis. **Clin. Exp. Imm.** v. 152(3), p. 415-22, 2008.

- FREDRIKSSON, L.; ALSTERGREN, P.; KOPP, S. Pressure pain thresholds in the craniofacial region of female patients with rheumatoid arthritis. **J. Orofac. Pain.** v. 17, n. 4, p. 326-332, 2003.
- FUJITA, S.; HOSHINO, K. Histochemical and immunohistochemical studies on the articular disk of the temporomandibular joint in rats. **Acta Anat.** v. 134, n. 1, p. 26-30, 1989.
- FUKUTO, J. M.; CHAUDHURI, G. Inhibition of constitutive and inducible nitric oxide synthase: potencil selective inhibition. **Ann. Rev. of Pharm. and Tox.** v. 35, p. 165-194, 1995.
- GE, X.; MA, X.; MENG, J.; ZHANG, C.; MA, K.; ZHOU, C. Role of Wnt-5A in interleukin-1beta – induced matrix metalloproteinase expression in rabbit temporomandibular joint condylar chondrocytes. **Arth. Rheum.** v. 60, n. 9, p. 2714-2722, Sept. 2009.
- GEGOUT, P.; GILLET, P.; CHEVRIER, D.; GUINGAMP, C.; TERLAIN, B.; NETTER, P. Characterization of zymozan-induced arthritis in rats: effects on joint inflammation and cartilage metabolism. **Life. Sci.**, v. 55, n. 17, p. 321-326, 1994.
- GONÇALVES, D. A.; DAL FABBRO, A.L.; CAMPOS, J.A.; BIGAL, M.E.; SPECIALI, J.G. Symptoms of temporomandibular disorders in the population: an epidemiological study. **J Orofac Pain.** v. 24, n. 3, p. 270-8, 2010.
- GONDIM, D.V.; COSTA, J.L.; ROCHA, S.S.; BRITO, G.A.C.; RIBEIRO, R.A.; VALE, M.L. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of electroacupuncture on experimental arthritis of the rat temporomandibular joint. **Can. J. Physiol. Pharm.** V. 90, p. 395-405, 2012.
- GRANGEIRO, N.M.G.; AGUIAR, J.A.; CHAVES, H.V.; SILVA, A.A.R.; LIMA, V.; BENEVIDES, N.M.B.; BRITO, G.A.C.; GRAÇA1, J.R.V.; BEZERRA, M.M. Heme oxygenase/carbon monoxide-biliverdin pathway may be involved in the antinociceptive activity of etoricoxib, a selective COX-2 inhibitor. **Pharm. Reports.** v. 63, p. 112-119, 2011.
- GOODMAN, L.S.; HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E.; GILMAN, A.G. As bases farmacológicas da terapêutica. 10 ed. **Rio de Janeiro: McGraw-Hill**, 2005.
- GOULART, A.C.; CORREIA, F.A.; SOUSA, S.C.; LUZ, J.G. Study of the inflammatory process induced by injection of carrageenan or formalin in the rat temporomandibular joint. **Pesqui. Odontol. Bras.**, v. 19, n. 1, p. 99-105, 2005.
- GREENE, C. S.; KLASSER, G. D.; EPSTEIN, J. B. Revision of the American Association of Dental Research's Science Information Statement about Temporomandibular Disorders. **J Can Dent Assoc.** v.76, p.a115, 2010.
- GREMEAUX, V.; DURAND, S.; BENAFIM, C.; HERISSON, C.; MONLEAUD, J.; HANSEL, S.; COUDEYRE, E. Evaluation of various ways to deliver information concerning non-steroidal anti-inflammatory drugs to osteoarthritis patients. **Annals of Physical and Reha. Med.** v. 56, p. 14–29, 2013.
- GUILLÉN, M.I.; MEGÍAS, J.; GOMAR, F.; ALCARAZ, M.J. Haem oxygenase-1 regulates catabolic and anabolic processes in osteoarthritic chondrocytes. **J. Pathol.** v. 214, n. 4, p. 515–522, 2008.

GUNSON, MICHAEL J.; ARNETT, G. W.; MILAM, STEPHEN B. Pathophysiology and Pharmacologic Control of Osseous Mandibular Condylar Resorption. **J. Oral Maxillofac Surg.** v. 70, p. 1918-1934, 2012.

HARGREAVES, K.M. Review - Orofacial pain. **Pain.** v.152, p.S25-S32, 2011.

HARNEDY, P. A.; FITZGERALD, R. J. Bioactive proteins, peptides and amino acids from macroalgae. **J. Phyco.** v. 47, p. 218-232, 2011.

HAYASHI, K.; WALDE, P.; MIYAZAKI, T.; SAKAYAMA, K.; NAKAMURA, A.; KAMEDA, K. MASUDA, S.; UMAKOSHI, H.; KATO, K. Active Targeting to Osteosarcoma Cells and Apoptotic Cell Death Induction by the Novel Lectin Eucheuma serra Agglutinin Isolated from a Marine Red Alga. **J. of Drug Delivery.** v. 2012, Article ID 842785, 11 pages, 2012.

HERSH, E.V.; BALASUBRAMANIAM, R.; PINTO, A.; Pharmacologic Management of Temporomandibular Disorders. **Oral. Max. Surg. Clin. N. Am.** v. 20, p.197–210, 2008.

HITCHON, C. A.; EL-GABALAWY, H. S. Oxidation in rheumatoid arthritis. **Arth. Res Ther.** v. 6, p. 265–78, 2004.

HOLANDA, M.L.; MELO, V.M.M.; SILVA, L.M.C.M.; AMORIM, R.C.N. PEREIRA, M.G.; BENEVIDES, N.M.B. Differential activity of a lectin from *Solieria filiformis* against human pathogenic bacteria. **Braz. J of Med. and Biol. Res.** v. 38, p. 1769-1773, 2005.

HORI, K.; MIYAZAWA, K.; ITO, K. Hemagglutinins in marine algae. **Bull. Jap. Soc. Sci. Fis.** v.47, p. 793-798, 1981

HORI, K.; IKEGAMI, S.; MIYAZAWA, K.; ITO, K. Mitogenic and antineoplastic isoagglutinins from the red alga *Solieria robusta*. **Phytochem.** v. 27, p. 2063–2067, 1988.

HORI, K.; MIYAZAWA, K.; ITO, K. Some common properties of lectins from marine algae. **Hydrobio.** v. 204/205, p. 561-566, 1990.

HSU, S. M.; RAINE, L. Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. **J. Histochem. Cytochem.** v. 29, n. 11, p. 1349-1353, 1981.

IMAI, H.; SAKAMOTO, I.; YODA, T.; YAMASHITA, Y. A model of internal derangement and osteoarthritis of the temporomandibular joint with experimental traction of the mandibular ramus in rabbit. **Oral Dis.** v. 7, p. 185-191, 2001.

ISRAEL, H. A.; LAVENGIN, C.J.; SINGER, M. D.; BEHRMAN, D.A. The relationship between temporomandibular joint synovitis and adhesions: pathogenic mechanisms and clinical implications for surgical management. **J. Oral Maxillofac Surg.** v. 64(7), p. 1066-1074, 2006.

JOLY, A.B. **Flora marinha do litoral norte do Estado de São Paulo e regiões circunvizinhas**, 1965, 406 fls. Tese (Doutorado). Faculdade de Filosofia, Ciência e Letras, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1965.

JACQUES, C.; GOSSET, M.; BERENBAUM, F.; GABAY, C. The role of IL-1 and IL-1Ra in joint inflammation and cartilage degradation. **VitamHorm.** v. 74, p. 371-403, 2006.

Jl, R.R.; ZHANG, Q.; LAW, P.Y.; LOW, H.H.; ELDE, R.; HOKFELT, T. Expression of mu-, delta- and kappa-opioid receptor-like immunoreactivities in rat dorsal root ganglia after carragennan-induced inflammation. **J. of neur.** v. 15, n. 2, p. 8156-66, 1995.

JÚNIOR, F.C.V.; SALES, A. B.; BARROS, F.C.N.; CHAVES, L.S.; FREITAS, A.L.P.; VALE, M.L.; RIBEIRO, R.A. M.; SOUZA, H. L. P.; MEDEIROS, J.V.R.; BARBOSA, A.L.R. Involvement of the NO/cGMP/PKG/KATP pathway and endogenous opioids in the antinociceptive effect of a sulphated-polysaccharide fraction extracted from the red algae, *Gracilaria caudate*. **Biom. & Prev. Nut.** v. 2, p.303–309, 2012.

KAMIYA H, OGATA K, HORI K. Isolation and characterization of a new lectin in the red alga *Palmaria palmata* (L.) O. Kuntze. **Bot. Marina.** v.15, p.537-540, 1982.

KANEYAMA, K.; SEGAMI, N.; NISHIMURA, M.; SUZUKI, T.; SATO, J. Importance of proinflammatory cytokines in synovial fluid from 121 joints with temporomandibular disorders. **Br. J. Oral Maxillofac. Surg.** v. 40, p.418-23, 2002.

KANEYAMA, K.; SEGAMI, N.; SATO, J.; NISHIMURA, M.; YOSHIMURA, H.; Interleukin-6 family of cytokines as biochemical markers of osseous changes in the temporomandibular joint disorders. **Br. J. Oral Maxillofac. Surg.** v. 42, p. 246-50, 2004.

KANNO T, TSUCHIYA A, SHIMIZU T.; TANAKA, A.; NISHIZAKI, T. Novel indomethacin action: selective and direct activation of protein kinase C- 3. **Cell Physiol Biochem.** v. 30 (3), p. 771e777, 2012.

KE, J.; LONG, X.; LIU, Y.; ZHANG, Y.F.; LI, J.; FANAG, W.; MENG, Q.G. Role NF-kB in TNF-  $\alpha$ - induced COX-2 Expression in Synovial Fibroblasts from Human TMJ. **J. Dent. res.** v.86, p. 363-367, 2007.

KELLY, M.; HWANG, J.M.; KUBBES,P. Modulating leukocyte recruitment in inflammation. **J. Allergy Clin. Immunol.** v. 120, p. 3-10, 2007.

KERINS, C.A.; CARLSON, D.S.; HINTON, R. J.; HUTCHINS, B.; GROGAN, D.M.; MARR, K.; KRAMER, P.R.; SPEARS, R.D.; BELLINGER, L. Specificity of meal pattern analysis as an animal model of determining temporomandibular joint inflammation/pain. **Inter. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 34, n. 4, p. 425-431, 2005.

KERINS, C.A.; CARLSON, D.S.; MCINTOSH, J.E.; BELLINGER, L.A. A role for cyclooxygenase II inhibitors in modulating temporomandibular joint inflammation from a meal pattern analysis perspective. **J. Oral Maxillofac. Surg.** V.62, n.8, p.989-995, 2004.

KEVILJ, R.; MEHULIC, K.; DUNDJER, A. Temporomandibular disorders and bruxism. **Part. I Min. Stomatol**, v. 56, p. 393-7, 2007.

KEYSTONE, E. C.; SCHORLEMMER, H.U.; POPE, C.; ALLISON, A.C. Zymozan-induced arthritis: a model of chronic proliferative arthritis following activation of the alternative pathway of complement. **Arth. Rheum.** v. 20, n. 7, p. 1396-1401, 1977.

KIM, Y.K.; KIM, S.G; KIM, B.S.; LEE, J.Y.; YUN, P.Y.; BAE, J.H.; OH, J.S.; AHN, J.M.; KIM, J.S.; LEE, S.Y. Analysis of the cytokine profiles of the synovial fluid in a normal temporomandibular joint: Preliminary study. **J. of C-Max-Fac Sur.** V. 40, p. 337-341, 2012.

KIM, T.W.; LEBKOWSKA-WIERUSZEWSKA, B.; OWEN, H.; YUN, H.I.; KOWALSKI, C.J.; GIORGI, M. Pharmacokinetic profiles of the novel COX-2 selective inhibitor cimicoxib in dogs. **The Vet. J.** 2013.

KITSOULIS, P.; MARINI, A.; ILIOU, K.; GALANI, V.; ZIMPIS, A.; KANAVAROS, P.; PARASKEVAS, G. Signs and Symptoms of Temporomandibular Joint Disorders Related to the Degree of Mouth Opening and Hearing Loss. **BMC Ear. Nose and Throat Disorders.** v. 11, n. 5, p. 1-8, 2011.

KOBAYASHI, Y. The regulatory role of nitric oxide in proinflammatory cytokine expression during the induction and resolution of inflammation. Mini-Review. **J. of Leuk. Bio.** v. 88, 2010.

KOSTRZEWA-JANICKA, J.; JURKOWSKI, P.; NĘDZI-GÓRA, M.; MIERZWIŃSKA-NASTALSKA, E. Inflammatory markers in temporomandibular joint disorders. **Centr Eur J Immunol.** v.37 (3), p. 290-293, 2012.

KUBOTA, E.; IMAMURA, H.; KUBOTA, T.; SHIBATA, T.; MURAKAMI, K. Interleukin 1 $\beta$  and stromelysin (MMP3) activity of synovial fluid as possible markers of osteoarthritis in the temporomandibular joint. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 55, n. 1, p. 20-27, 1997.

KUBOTA, E.; KUBOTA, T.; MATSUMOTO, J.; SHIBATA, T.; MURAKAMI, K. Synovial fluid cytokines and proteinases as markers of temporomandibular joint disease. **J. Oral Maxillofac. Surg.** v. 56, n. 2, p. 192-198, 1998.

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

KURODA, S.; TANIMOTOZ, K.; IZAWAY, T.; FUJIHARAY, S.; KOOLSTRAX, J.H.; TANAKA, E. Review - Biomechanical and biochemical characteristics of the mandibular condylar cartilage. **Osteo. and Cart.** v.17, p.1408-1415, 2009.

LANDER, H.M.; SEHAJPAL,P.; LEVINE, D.M.; NOVOGRODSKY, A. Activation of human peripheral blood mononuclear cells by nitric oxide-generating compounds. **J. Immunol.** v. 150, n. 4, p. 1509-1516, 1993.

LAZAROV, N.E. Comparative analysis of the chemical neuroanatomy of the mammalian trigeminal ganglion and mesencephalic trigeminal nucleus. **Prog. Neurobiol.** v. 66(1), p. 19-59, 2002.

LEFKOWITZ, D.L.; GELDERMAN, M.P; FUHRMANN, S.R.; GRAHAM, S.; STARNES, J.D.R.D.; LEFKOWITZ, S.S; BOLLEN A.; MOGUILEVSKY, N. Neutrophilic myeloperoxidase-macrophage interactions perpetuate chronic inflammation associated with experimental arthritis. **Clin Immunol.** v. 91, n. 2, p. 145-155, 1999.

- LEES, P.; LANDONI, M. F.; GIRAUDEL, J.; TOUTAIN, P. L. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in species of veterinary interest. **J. Vet. Pharmacol. Ther.** v.27, p. 479-490, 2004
- LEKKAS, C. Experimental degenerative temporomandibular joint disease. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 23, p. 423-424, 1994.
- LEITE, Y.F.M.M.; SILVA, L.M.C.M.; AMORIM, R.C.N.; FREIRE, E.A.; JORGE, D.M.M.; GRANGEIRO, T.B.; BENEVIDES, N.M.B. Purification of a lectin from the marine red alga *Gracilaria ornata* and its effects on the development of the cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Bioch. et Biophys. Acta**, v.1724, p. 137-145, 2005.
- LIAO, W. R.; LIN, J.Y.; SHIEH, W.Y.; JENG, W.L.; HUANG, R. Antibiotic activity of lectins from marine algae against marine vibrios. **J. Ind Microbiol Biotchnol.** v. 30, p. 433-439, 2003.
- LIS, H.; SHARON, N. Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition, **Chemical Rev.** v. 98, p. 637-674, 1998.
- LIS, H.; SHARON, N. Biological properties of lectins. **The lectins: properties, functions and application in biology and medicine**, p. 265-291, 1986.
- LIU, H.X.; LIANG, Q. J.; XIAO, P.; JIAO, H. X.; GAO, Y.; AHMETJIANG, A. The effectiveness of cognitive-behavioural therapy for temporomandibular disorders: a systematic review. **J. Oral Rehabil.** v. 39, n. 1, p. 55-62, 2012.
- LOESER, J.D.; TREEDE, R.D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain.** v. 137, p. 473-477, 2008.
- MA, M.T.; YEO, J.F.; SHUI, G.; WENK, M.R.; ONG, W.Y. Systems wide analyses of lipids in the brainstem during inflammatory orofacial pain- Evidence of increased phospholipase A2 activity. **Eur. Jour. of Pain.** v.16 (1), p. 38-48, 2011.
- MADENOGLU, H.; KACMAZ, M.; AKSU, R.; BICER, C.; YABA, G.; YILDIZ, K.; DOGRU, K. BOYACI, A. Effects of Naloxone and Flumazenil on Antinociceptive Action of Acetaminophen in Rats. **Current Therap. Res.** v.71, n. 2, p. 111-118, 2010.
- MANFREDINI, D.; CANTINI, E.; ROMAGNOLI, M.; BOSCO, M. Prevalence of bruxism in patients with different research diagnostic criteria for temporomandibular disorders (RDC/TMD) diagnoses. **Cranio.** v. 21, n. 4, p. 279-285, 2003.
- MATTHEWS, B.; SESSLE, B.J. Mecanismos periféricos da dor orofacial. In: Dor orofacial – Da ciência Básica à Conduta Clínica. 1ª ed. **Quintessence.** p. 37-46, 2002.
- MCINNES, I.B.; SCHETT, G. The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. **N. engl. J. Med.** v. 365, n.23, p. 2205-2219, 2011.
- MCINNES, I.B.; LEUNG, B.E.; FIELD, M.; WEI, X.Q.; HUANG, F.P.; STURROCK, R.D.; KINNINMONTHFL, A.; WEIDNER, J.; MUMFORD, R.; LIEW, F.Y. Production of nitric oxide in the synovial membrane of rheumatoid and osteoarthritis patients. **J. Exp. Med.** v. 184, n.4, p. 1519-1524, 1996.

MCCOUBREY WK., HUANG TJ, MAINES MD. Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. **Eur J Biochem**, v. 247:725-32,1997.

MCCOUBREY, W. K. JR.; EWING, J. F.; MAINES, M. D. Human heme oxygenase-2: characterization and expression of a full-length cDNA and evidence suggesting that the two HO-2 transcripts may differ by choice of polyadenylation signal. **Arch Biochem. Biophys.** v. 295, p. 13-20, 1992.

MEGIAS, J.; GUILLEN, MI.; CLERIGUES, V. Heme oxygenase -1 induction modulates microsomal prostaglandin E synthase -1 expression and prostaglandin E(2) production in osteoarthritic chondrocytes. **Bioch. Pharm.** v. 77, p. 1806-1813, 2009.

MEJERSJÖ, C.; WENNEBERG, B. Diclofenac sodium and occlusal splint therapy in TMJ osteoarthritis: a randomized controlled trial. **J. of Oral Reh.** v. 35, P. 729–738, 2008.

MIZUI, T.; ISHIMARU, J.I.; MIYAMOTO, K.; KURITA, K. Matrix metalloproteinase-2 in synovial lavage fluid of patients with disorders of the temporomandibular joint. **Br. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 39, p. 310-314, 2001.

MONTEIRO, D.R.; ZUIM, P.R.J.; PESQUEIRA, A.A.; RIBEIRO, P.P.; GARCIA, A.R. Relationship between anxiety and chronic orofacial pain of temporomandibular disorder in a group of university students. **J. of Prost. Res.** v. 55, p. 154–158, 2011.

MOON, D.O.; KIM, M.O.; CHOI, Y.H.; PARK, Y.M.; KIM, G.Y. Curcumin attenuates inflammatory response in IL-1 [beta]-induced human synovial fibroblasts and collagen-induced arthritis in mouse model. **Int. immunophar.** v. 10, n. 5, p. 605- 610, 2010.

NAGANO, C.S.; DEBRAY, H.; NASCIMENTO, K.S.; PINTO, V.P.T.; CAVADA, B.S.; SAMPAIO, S.S.; FARIAS, W.R.L.; SAMPAIO, A.H.; CALVETE, J.J. HCA and HML isolated from the red marine algae *Hypnea cervicornis* and *Hypnea musciformis* define a novel lectin family. **Prot. Sci.** v. 14, p. 2167-2176, 2005.

NEEB, L.; HELLEN, P.; BOEHNKE, C.; HOFFMANN, J.; SCHUH-HOFER, S.; DIRNAGL, U.; REUTER, U. IL-1b Stimulates COX-2 Dependent PGE2 Synthesis and CGRP Release in Rat Trigeminal Ganglia Cells. **PLoS ONE.** v. 6(3): e17360. doi:10.1371, 2011.

NETTER, F. H. **Atlas de Anatomia Humana.** 2 ed., Porto Alegre: Artmed, 2000.  
NEUBERT, J.K.; WIDMER, C.G.; MALPHURS, W.; ROSSI, H.L.; JR., C.J.V. CAUDLE, R.M. Use of a novel thermal operant behavioral assay for characterization of orofacial pain sensitivity. **Pain.** v. 116, p. 386-395, 2005.

NEVES, S.A.; DIAS-BARUFFI, M.; FREITAS, A. L. P.; ROQUE-BARREIRA, M. C. Neutrophil migration induced *in vivo* e *in vitro* by marine algal lectins. **Inflam. Res.** v. 50, p. 486-490, 2001.

NOZAWA-INOUE, K.; AMIZUKA, N.; IKEDA, N.; SUZUKI, A.; KAWANO, Y.; MAEDA, T. Synovial membrane in the temporomandibular joint – Its morphology, function and development. **Arch. Histol. Cytol.** v. 66, n. 4, p. 289-306, 2003.

OBERMANN, M. Treatment options in trigeminal neuralgia. **Therap. Adv. in neur. Disor.** v. 3, p. 107-115, 2010.

OKESON, J. P. Dor orofacial: guia para avaliação, diagnóstico e tratamento. São Paulo (SP): **Santos Livraria**, 1998.

OKESON, J. P. Dores Bucofaciais de Bell. 5. ed. São Paulo: **Quintessence**, 2003.

OKESON, J. P. Tratamento das Desordens Temporomandibulares e Oclusão, **Elsevier**, Rio de Janeiro, 2008.

OKUBO, M., CASTRO, A., GUO, W., ZOU, S., REN, K., WEI, F., KELLER, A., DUBNER, R. Transition to Persistent Orofacial Pain after Nerve Injury Involves Supraspinal Serotonin Mechanisms. **The J. of Neurosci.** v. 33(12), p. 5152–5161, 2013.

OLIVEIRA-FUSARO, M.C.G.; CLEMENTE-NAPIMOGA, J.T.; TEIXEIRA, J.M.; TORRES-CHÁVEZ, K.E.; PARADA, C.A.; TAMBELI, C.H. 5-HT induces temporomandibular joint nociception in rats through the local release of inflammatory mediators and activation of local  $\beta$  adrenoceptors. **Pharm., Bioch. and Beh.** v.102, p. 458–464, 2012.

OLIVEIRA, S.R.M.; NASCIMENTO, A.E.; LIMA, M.E.P.; LEITE, Y.F.M.M.; BENEVIDES, N.M.B. Purification and characterisation of a lectin from the red marine alga *Pterocladia capilacea* Santel & Hommers. **Rev. Bra. de Bot.** v. 25, p. 397-403, 2002.

OMOKAWA, Y.; MIYAZAKI, T.; WALDE, P.; AKIYAMA, K.; SUGAHARA, T.; MASUDA, S.; INADA, A.; OHNISHI, Y.; SAEKI, T.; KATO, K. In vitro and in vivo anti-tumor effects of novel Span 80 vesicles containing immobilized *Eucheuma serra* agglutinin. **Int. J. Pharm.** v. 15, p. 157-167, 2010.

O'NEIL, C. K.; HANLON, J T. Marcum, Z. A. Adverse Effects of Analgesics Commonly Used by Older Adults With Osteoarthritis: Focus on Non-Opioid and Opioid Analgesics. **The Ame. J. of Ger. Phar.** v. 10, n. 6, 2012.

PAIM, L.B. **Ação antiinflamatória da lectina de semente de *Dioclea Violacea* na artrite induzida por zymosan.** 2006. 60 fls. Dissertação (mestrado em Bioquímica). Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica, Universidade Federal do Ceará- UFC, 2006.

PAIVA, A.A.O.; CASTRO, A.J.G.; NASCIMENTO, M.S.; WILL, L.S.E.P.; SANTOS, N.D.; ARAÚJO, R.M.; XAVIER, C.A.C.; ROCHA, F. A.; LEITE, E.L. Antioxidant and anti-inflammatory effect of polysaccharides from *Lobophora variegata* on zymosan-induced arthritis in rats. **Int. Immunopharm.** v. 11, p.1241–1250, 2011.

PANÉS, J.; PERRY, M.; GRANGER, D.N. Leukocyte-endothelial cell adhesion: avenues for therapeutic intervention. **Br. J. Pharm.** v. 126, p. 537-550,1999.

PARIJS, J.V.; BROEKAERT, W.F.; GOLDSTEIN, I. J.; PEUMANS, W.J. Havein: na antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. **Planta.** v. 183, p. 258-264, 1991.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. N. Lectin as plant defense proteins. **Plant Phys.** v. 109, p. 347-352, 1995.

PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E.J.M. Plant lectins: versatile proteins with important perspectives in biotechnology. **Bio. and Gen. Eng. Reviews.** v. 15, p. 199-228, 1998.

PICOLO, G., GIORGI, R., CURY, Y.  $\delta$ - Opioid receptor nitric oxide mediate the analgesic effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom. **Eur. J. Pha.** v. 391, p.55 - 62, 2000.

PORRECA, F; OSSIPOV, M. H.; GEBHART, G. F. Chronic pain and medullary descending facilitation. **Tre. Neurosci.** v. 25, p. 319-124, 2002.

POSADAS, I.; BUCCI, M.; ROVIEZZO, F.; ROSSI, A.; PARENTE, L.; SAUTEBIN, L.; CIRINO, G. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. **British J. of Phar.** v. 142, p. 331-338, 2004.

QUEIROZ, I. N. L. **Caracterização estrutural preliminar e efeitos na inflamação da lectina da alga marinha verde *Caulerpa cupressoides*.** 2013. 115 fls. Dissertação (mestrado em Bioquímica). Departamento de Bioquímica E Biologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Ceará, 2013.

RACICH, M.J. Orofacial pain and occlusion: Is there a link? An overview of current concepts and the clinical implications. **J. Prosthet Dent.** v.93, n.2, p. 189-196, 2005.

RAFFIN, R.P.; OBASH, G.; MEZZALIR, A.R.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. nanocápsulas Poliméricas Secas Contendo Indomentacina: Estudo de formulação de Tolerância Gastrintestinal em Ratos. **Acta. Farm. Bon.** v. 2, p. 163-172, 2003.

RAMOS, A. M. O. **Artrite experimental induzida por zymosan: caracterização citológica, histopatológica e imuno-histoquímica da sinóvia e estudos histoquímico e bioquímicos dos glicoconjugados da matriz condróide.** 2000. 134 fls. Tese (Doutorado em Patologia). Departamento de Anatomia Patológica e Patologia Clínica, Programa de Pós-Graduação em Patologia, Universidade Federal de São Paulo, 2000.

RANDO, C.; WALDRON, T. TMJ osteoarthritis: A new approach to diagnosis. **Amer. J. of Physical Anthr.** v. 148(1), p. 45-53, 2012.

REISINE, T. Molecular mechanisms of opiate receptor coupling to G proteins and effector systems. **Ann. of the New York Acad. Sci.** v. 780, p. 168-175, 1996.

REN, K.; DUBNER, R. Central nervous system plasticity and persistent pain. **J. Orofac. Pain.** v. 13(3), p.:155-171, 1999.

REN, K.; DUBNER, R. The role of trigeminal interpolaris-caudalis transition zone in persistent orofacial pain. **Int. Rev. Neurobiol.** v.97, p.207-25, 2011.

RHODUS, N.L; CHENG, B; BOWLES, W; MYERS, S; MILLER, L.; ONDREY, F. Proinflammatory cytokine levels in saliva before and after treatment of (erosive) oral lichen planus with dexamethasone. **Oral. Dis.** v. 12, n. 2, p. 112-116, 2006.

RIDGER, V. C.; PETTIPHER, E. R.; BRYANT, C. E.; BRAIN, S. D. Effect of the inducible nitric oxide synthase inhibitors aminoguanidine and L-N<sup>6</sup>-(1-iminoethyl)lysine on zymosan-induced plasma extravasation in rat skin. **J. Immunol.** v. 159, p. 383-390, 1997.

ROCHA, F. A. C.; ANDRADE, L. E. C.; JANCAR, S. Immune complex induced arthritis in rats: role of lipid mediators on cell infiltration. **Med. Inflamm.** v. 5, p. 104-109, 1996.

ROCHA, F. A. C. PAF modulates eicosanoids and TNF release in immune-complex arthritis in rats. **J. Lipid Mediators Cells Sig.** v.16, p. 1-10, 1997.

ROCHA, J. C.S.; PEIXOTO, M.E.B.; JANCAR, S.; CUNHA, F.Q.; RIBEIRO, R. A.; ROCHA, F.A.C. Dual effect of nitric oxide in articular inflammatory pain in zymosan-induced arthritis in rats. **British J. of Phar.** v. 136, p.588 -596, 2002.

ROCHA, F. A. C.; ARAGÃO, J. R.; DE OLIVEIRA, R. C.; VALE, M. R.; RIBEIRO, R. A. Periarthritis promotes articular incapacitation in zymosan-induced arthritis in rats. **Inflamm. Res.** v. 48, p. 485-490, 1999.

ROCHA, F. A. C.; ROCHA, J. C.S.; PEIXOTO, M.E.B.; JANCAR, S.; CUNHA, F.Q.; RIBEIRO, R. A. Efeito de inibidores da sintase de óxido nítrico na dor inflamatória articular e influxo celular da artrite induzida por zymosan em ratos. **Ver. Bras. Reumatol.** v.43, n. 4, p. 206-217, 2003.

ROCHA, F.A.C.; TEIXEIRA, M.M.; ROCHA, J.C.S.; GIRÃO, V.C.C.; BEZERRA, M.M.; RIBEIRO, R.A.; CUNHA, F.Q. Blockade of Leukotriene 4 prevents articular incapacitation in rat zymosan-induced arthritis. **Eur. J. Pharmacol.** v. 497, p.81-86, 2004.

RODRIGUES, A. R. C. **Role of il-1B in rheumatoid arthritis.** 2012. 91 fls. Tese (Doutorado em Ciências Biomédicas). Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, 2012.

ROGERS, D.J.; BLUNDEN, B.; EVANS, P.R. *Ptilota plumosa*, a new source of a blood group B specific lectin. **Med. Lab. Sci.** v. 34, p. 193-200, 1977.

ROGERS, D.J.; HORI, K. Marine algal lectins: new developments. **Hydrobio.** v. 260-261, p. 589-593, 1993.

ROGERS, D.J.; BLUNDEN, B.; EVANS, P.R. *Ptilota plumosa*, a new source of a blood group B specific lectin. **Med Lab. Sci.** v. 34, p. 193-200, 1977.

RÜDIGER, H.; GABIUS, H.J. REVIEW -Plant lectins: Occurrence, biochemistry, functions and applications. **Glycocon. J.** v. 18, p. 589-613, 2001.

SANDYA, S.; SUDHAKASAN, P.R. Effect of glycosaminoglycans on matrix metalloproteinases in type II collagen-induced experimental arthritis. **Exp. Bio. and Med.** V. 232, p. 629-637, 2007.

SAUNDERS, B.M.; TRAN, S.; RUULS, S.; SEDGWICK, J.D.; BRISCOE, H.; BRITTON, W.J. Transmembrane TNF is sufficient to initiate cell migration and granuloma formation and provide acute, but not long-term, control of Mycobacterium tuberculosis infection. **J. Immunol.** v. 174, p. 4852-4859, 2005.

SATO, Y.; SUZUKI, H.; SATO, T.; SUDA, T.; YODA, T.; IWAKURA, Y.; CHIDA, D. The role of endogenous glucocorticoids in lymphocyte development in melanocortin receptor 2-deficient mice. **Bio. and Bioph. Res. Comm.** v. 403, p. 253–257, 2010.

SATO, Y.; HIRAYAMA, M.; MORIMOTO, K.; YAMAMOTO, N.; OKUYAMA, S.; HORI K. High Mannose-binding Lectin with preference for the cluster of  $\alpha$  1-2 Mannose from green Alga *Boodlea coacta* is potent inhibitor of HIV-1 and Influenza Viruses. **J. Biol. Chem.** v.286, p. 19446-19458, 2011.

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

SCHÄFER, M.; CARTER, L.; STEIN, C. Interleukin 1 and corticotrophin releasing factor inhibit pain by releasing opioids from immune cells in inflamed tissue. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v.91, n. 10, p. 4219-23, 1994.

SCHOLZ, M.; BLOBAUM, A.L.; MARNETT, L. J. HEY-HAWKINS, E. Ortho-Carborane derivatives of indomethacin as cyclooxygenase (COX)-2 selective inhibitors. **Bioorg. & Med. Chem.** v.20, p.4830–4837, 2012.

SHAEFER, J.R.; HOLLAND, N.; WHELAN, J.S.; VELLY, A.M. Pain and Temporomandibular Disorders: A Pharmaco-Gender Dilemma. **Dent Clin. N. Am.** v. 57, p. 233–262, 2013.

SHINODA, C.; TAKAKU, S. Interleukin-1 $\beta$ , interleukin-6, and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in the synovial fluid of the temporomandibular joint with respect to cartilage destruction. **Oral Dis.** v. 6, p. 383-390, 2000.

SHIBUTA K, SUZUKI I, SHINODA M, TSUBOI Y, HONDA K, SHIMIZU N, SESSLE BJ, IWATA K Organization of hyperactive microglial cells in trigeminal spinal subnucleus caudalis and upper cervical spinal cord associated with orofacial neuropathic pain. **Brain Res.** v. 1451, p.74–86, 2012.

SHINAL, R.M, FILLINGIM, R.B. Overview of Orofacial Pain: Epidemiology and Gender Differences in Orofacial Pain. **Dent Clin. N. Am.** v. 51, p. 1–18, 2007.

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

SESSLE, B.J. Recent Insights into Brainstem Mechanisms Underlying Craniofacial Pain. **J. of Dent. Ed.** v. 66 (1), p. 108-112, 2002.

SILVA, N. S. F., SAKATA, R. K., ISSY, A. M. Effects of different spinal morphine doses in rats. **Rev. Bras. Anesthesiol.** v.54, n.1, p.60-67, 2004.

SILVA, L.M.C.M.; HOLANDA, M.L.; PINHEIRO, P.G.; RODRIGUES, J.A.; LIMA, M.E.; BENEVIDES, N.M. Antinociceptive and Anti-inflammatory Activities of Lectin from Marine Red Alga *Pterocliadiella capillacea*. **Bio. and Pha. Bull.** v. 33, p. 830-835, 2010.

SIQUEIRA, J.T.T.; TEIXEIRA, M.J. Dores orofaciais - diagnóstico e tratamento. São Paulo: **Artes Méd.**, 2012.

SOARES, M.P.; BACH, F.H. Heme oxygenase-1: from biology to therapeutic potential, **Trends in Mol. Med.** v. 15, p. 50-58, 2009;

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CEFALEIA (SBC). Dores Orofaciais e Disfunção Têmporo-Mandibular, 2010. Disponível em: <http://www.sbce.med.br>. Acesso em: 24 de Nov. 2013.

SOSTRES, C.; GARGALLO, C.J.; ARROYO, M.T.; LANAS, A. Adverse effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs, aspirin and coxibs) on upper gastrointestinal tract. **Best Prac. & Res. Clin. Gastroent.** v. 24 p.121–132, 2010.

STAMLER, J.S.; SINGEL, D.J.; LOSCALZO, J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. **Sci.** v. 258, p. 1898-1992.

STENGEL, D. B.; CONNAN, S.; POPPER, Z.A. Algal chemodiversity and bioactivity: Sources of natural variability and implications for commercial application. **Biotechn. Adv.** v. 29, p. 483-501, 2011.

SUMA, S.; KUMAR, B. Temporomandibular disorders and functional somatic syndromes: Deliberations for the dentist. **Indian J. Dent Res.** v. 23(4), p. 529-536, 2012.

SUZUKI T, SEGAMI N, KANEYAMA K, NISHIMURA M, NOJIMA T. Specific expression of interleukin-1-in the temporomandibular joints with internal derangement: correlation with clinical findings. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.** v.88, p. 413–417, 1999.

SUZUKI, T.; SEGAMI, N.; NISHIMURA, M.; NOJIMA, T. Co-expression of interleukin- 1 $\beta$  and tumor necrosis factor an in synovial tissues and synovial fluido of temporomandibular joint with internal derangement: comparison with histological grading of synovial inflammation. **J. Oral Pathol Med.** v. 31, p. 549-57, 2002.

SVENSSON, P. CAIRNS, B.E.; WANG, K.; ARENDT-NIELSEN, L. Injection of nerve growth factor into human masseter muscle evokes long-lasting mechanical allodynia and hyperalgesia. **Pain.** v. 104, p. 241-247, 2003.

TANAKA, E.; DETAMORE, M.S.; TANIMOTO, K.; KAWAI, N. Lubrication of the temporomandibular joint. **Ann. of Biom. Engin.** v. 36, n. 1, p. 14-29, 2008.

TAKEDA, M.; TANIMOTO, T.; IKEDA, M.; NASU, M.; KADOI, J.; YOSHIDA, S.; MATSUMOTO, S. Enhanced excitability of rat trigeminal root ganglion neurons via decrease in A-type potassium currents following temporomandibular joint inflammation. **Neurosci.** v. 138, n. 2, p. 621-630, 2006.

TAKEDA, M.; TANIMOTO, T.; KADOI, J.; NASU, M.; TAKAHASHI, M. et al. Enhanced excitability of nociceptive trigeminal ganglion neurons by satellite glial cytokine following peripheral inflammation. **Pain.** v. 129, p. 155–166, 2007.

TAKEMURA, M., SUGIYO, S., MORITANI, M., KOBAYASHI, M., YONEHARA, N., Mechanisms of orofacial pain control in the central nervous system. **Arch. Histol. Cytol.**, v.69, p. 79-100, 2006.

TAKEUCHI, Y.; ZEREDO, J.L.; FUJIYAMA, R.; AMAGASA, T.; TODA, K. Effects of experimentally induced inflammation on temporomandibular joint nociceptors in rats. **Neurosci. Lett.** v. 354, n. 2, p. 172-174, 2004.

THOMASSEN, M.J.; KAVURU, M.S. Human alveolar macrophages and monocytes as a source and target for nitric oxide. **Int. Immunopharm.** v. 1, n. 8, p. 1479-1490, 2001.

TING, E.; ROVERONI, R.C; FERRARI, L.F; LOTUFO, C.M; VEIGA, M.C.; PARADA, C.A.; TAMBELI, C.H. Indirect mechanism of histamine-induced nociception in temporomandibular joint of rats. **Life Sci.** v. 81, n. 9, p.765-71, 2007.

TOMINAGA K, ALSTERGREN P, KURITA H, KOPP S. Clinical course of an antigen-induced arthritis model in the rabbit temporomandibular joint. **J. Oral Pathol. Med.** v. 28, n. 6, p. 268-73, 1999.

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

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

TUCHS, F. D.; WANNMACHER, L. Farmacologia clínica: fundamentto da terapêuticaracional. 2ª Ed. Rio de Janeiro: **Guanabara koogan**, 1998.

VAN DAMME, E.J.M.; PEUMANS, W.J.; BARRE, A.; ROUGÉ, P. Plant lectins: a composite of several distinct families of structural and evolutionary related proteins with diverse biological roles, **Crit. Rev. in Plant Sci.** v. 17, p. 575-692, 1998.

VANDERLEI, E.S.O. ; PATOILO, K.K.N.R.; LIMA, N.A.; LIMA, A.P.S.; RODRIGUES, J.A.G.; SILVA, L.M.C.M.; LIMA, M.E.P.; LIMA, V.; BENEVIDES, N.M.B. A Antinociceptive and anti-inflammatory activities of lectin from the marine green alga *Caulerpa cupressoides*. **Int. Immunophar.** v. 10, p. 1113-1118, 2010.

VANDERLEI, E.S.O. ; ARAÚJO, I.W.; QUINDERÉ, A.L.; FONTES, B.P.; ELOY, Y.R.; RODRIGUES, J.A.; SILVA, A.A.; CHAVES, H.V.; JORGE, R.J.; MENEZES, D.B.; EVANGELISTA, J.S.; BEZERRA, M.M.; BENEVIDES, N.M. The involvement of the HO-1 pathway in the anti-inflammatory action of a sulfated polysaccharide isolated from the red seaweed *Gracilaria birdiae*. **Inflam. Res.** v. 60, p. 1121-1130, 2011.

VAL, D. R. **Eficácia e segurança de *tephrosia toxicaria* pers. na artrite da articulação temporomandibular induzida por zymosan em ratos: envolvimento do óxido nítrico, hemeoxigenase-1 e canais de potássio atp-dependentes.** 2012. 123 fls. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Ceará, Sobral, 2012.

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

VASSALLI, P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. **Annu. Rev. Immunol.**v. 10, p. 411-52,1992.

VENKATESHA, S. H.; BERMAN, B. M.; MOUDGIL, K. D. Review- Herbal medicinal products target defined biochemical and molecular mediators of inflammatory autoimmune arthritis. **Bioorg. & Med. Chem.** v. 19, p. 21-29, 2011.

VERBURGH, C.A; HART, M.H; AARDEN, L.A; SWAAK, A.J. Interleukin-8 (IL-8) in synovial fluid of rheumatoid and nonrheumatoid joint effusions. **Clin. Rheum.** v.12, p. 494 e 499,1993.

VERRI-JUNIOR, W.A.; CUNHA, T.M.; PARADA, C.A.; POOLE, S.; CUNHA, F.Q; FERREIRA, S.H. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: Targets for analgesic drug development? **Pharm. & Ther.** v. 112, p. 116-138, 2006.

VIANA, G.S.B.; FREITAS, A.L.; LIMA, M.M.; VIEIRA, L.A.; ANDRADE, M.C.; BENEVIDES, N.M. Antinociceptive activity of sulfated carbohydrates from the algae *Bryothamnion seaforthii* (Turner) Kütz and *B. triquetrum* (S.G. Gmel) M. Howe. **Braz. J. of Med. and Bio. Res.** v. 37, p. 713-722, 2002.

VICENTE, A. M.; GUILLEN, M. I.; HABIB, A.; ALCARAZ, M. J. Beneficial effects of heme oxygenase-1 up-regulation in the development of experimental inflammation induced by zymosan. **J. of Pharm. and Exp. Therap.** v. 307, p. 1030-1037, 2003.

VIDOTTI, E.C.; ROLLEMBERG, M.C.E. Algas: Da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. **Química Nova.** v. 27, n. 1, p. 139-145, 2004.

VIJAYAN, M.; CHANDRA, N. Current opinion in structural biology. **Lectins.** v. 9, p. 707-714, 1999.

VILLA, G.; CERUTI, S.; ZANARDELLI, M.; MAGNI, G.; JASMIN, L.; OHARA, P.T.; ABBRACCHIO, M.P. Temporomandibular joint inflammation activates glial and immune cells in both the trigeminal ganglia and in the spinal trigeminal nucleus. **Mol. Pain,** v. 10, n. 6, p 89-104, 2010.

VOOG. U.; ALSTERGREN, P.; LEIBUR, E.; KALLIKORM, R.; KOPP, S. Influence of serotonin on the analgesic effect of granisetron on temporomandibular joint arthritis. **Mediat. Inflamm.** v.13, p.373–6, 2004.

ZAMMA, T. Adjuvant-induced arthritis in the temporomandibular joint of rats. **Infect. Immun.** v. 39, n. 3, p. 1291-1299, 1983.

ZAMAN, F.; CHRYSISB, D; HUNTJENSA, K.; CHAGIN, A.; TAKIGAWAC, M; FADEELD, B.; SÄVENDAHLA, L. Dexamethasone differentially regulates Bcl-2 family proteins in human proliferative chondrocytes: Role of pro-apoptotic Bid. **Tox. Lett.** v. 224, p.196– 200, 2014.

ZOLLNER, C.; SHAQURA, M. A.; BOPAIAH, C.P.; MOUSA, S.; STEIN, C.; SCHAFER, M. Painful inflammation-induced increase in mu-opioid receptor binding and G-protein coupling in primary afferent neurons. **Mol. Phar.** v. 64, n. 2, p. 202-210, 2003.

ZIÓŁKOWSKA, N. E.; WLODAWER, A. Structural studies of algal lectins with anti-HIV activity. **Acta Biochim. Pol.** v. 53, p. 617–26, 2006.

WANG, Y.Z.; SUN, S.Q.; ZHOU, Y.B. Extract of the dried heartwood of *Caesalpinia sappan* L. attenuates collagen-induced arthritis. **J. of Ethnopharm.** v.136, p.271– 278, 2011.

WAITE, P. M., ASHWELL, K. W. Trigeminal Sensory System. In: PAXINOS, G.; MAI, J. K. **The Hum. Ner. Sys.** USA: Elsevier, p. 1093-1124, 2004.

WHITE. F; WILSON, N. Opiate-induced hypernociception and chemokine receptors. **Neuropharm.** v.58, p. 35-37, 2010.

WILLARD VP, KALPAKCI KN, REIMER AJ, ATHANASIOU KA. The regional contribution of glycosaminoglycans to temporomandibular joint disc compressive properties. **J. Biomech. Eng.**, v. 134, n. 1, p. 1-8, 2012.

WILLMENT, J.A.; LIN, H.H.; REID, D.M.; TAYLOR, P.R.; WILLIAMS, D.L.; WONG, S.Y.; GORDON, S.; BROWN, G.D. Dectin-1 expression and function are enhanced on alternatively activated and GM-CSF-treated macrophages and are negatively regulated by IL-10, dexamethasone, and lipopolysaccharide. **J. of Immun.** v. 171, p. 4569-4573, 2003.

WIJESINGHE, W.A.J.P.; JEON, YOU-JIN. Enzyme-assisted extraction (EAE) of bioactive components: A useful approach for recovery of industrially important metabolites from seaweeds: A review. **Fitoterapia.** v. 83, p. 6–12, 2011.

WU, G.; CHEN, L.; FEI, H.; SU, Y.; ZHU, G.; CHEN, Y. Psychological stress may contribute to temporomandibular joint disorder in rats. **J. of sur. res.** v.183, p. 223 e 229, 2013.

YACHIE, A.; TOMA, T.; MIZUNO, K.; OKAMOTO, H.; SHIMURA, S.; OHTA, K., KASAHARA, Y. and KOIZUMI, S., Heme oxygenase-1 production by peripheral blood monocytes during acute inflammatory illnesses of children. **Exp. Biol. Med. (Maywood).** v. 228, p.550-556, 2003.