



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DOUTORADO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

**MODELO DE HIPERNOCICEPÇÃO ARTICULAR NA ARTICULAÇÃO
TEMPOROMANDIBULAR INDUZIDA POR ZYMOSAN EM RATOS E
ESTUDO DA VIA DA HEMEOXIGENASE-1/BILIVERDINA/MONÓXIDO
DE CARBONO**

HELLÍADA VASCONCELOS CHAVES

Fortaleza - Ceará - Brasil

Junho/2012

Hellíada Vasconcelos Chaves

**MODELO DE HIPERNOCICEPÇÃO ARTICULAR NA ARTICULAÇÃO
TEMPOROMANDIBULAR INDUZIDA POR ZYMOSAN EM RATOS E ESTUDO DA
VIA DA HEMEOXIGENASE-1/BILIVERDINA/MONÓXIDO DE CARBONO**

Tese de Doutorado apresentada ao
Doutorado em Ciências Médicas do
Departamento de Medicina Clínica da
Faculdade de Medicina da Universidade
Federal do Ceará para obtenção do título
de Doutor em Ciências Médicas.

Orientador:

Prof^a Dr^a Gerly Anne de Castro Brito

Fortaleza - Ceará - Brasil

Junho/2012

**MODELO DE HIPERNOCICEPÇÃO ARTICULAR E NA ARTICULAÇÃO
TEMPOROMANDIBULAR INDUZIDA POR ZYMOSAN EM RATOS E ESTUDO DA
VIA DA HEMEOXIGENASE-1/BILIVERDINA/MONÓXIDO DE CARBONO**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas.

Aprovada em 13/07/2012

BANCA EXAMINADORA

**Profª Drª Gerly Anne de Castro Brito
Universidade Federal do Ceará (UFC)**

**Prof Dr Thiago Mattar Cunha
Universidade de São Paulo (USP)**

**Profª Drª Juliana Trindade Clemente Napimoga
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)**

**Profª Drª Karuza Maria Alves Pereira
Universidade Federal do Ceará (UFC) - *Campus* Sobral**

**Profª Drª Mirna Marques Bezerra
Universidade Federal do Ceará (UFC) - *Campus* Sobral**

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Medicina da UFC - *Campus* Fortaleza, especialmente ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas.

Ao Curso de Odontologia da UFC - *Campus* Sobral, por permitir conciliar a realização do Doutorado.

Ao Curso de Medicina da UFC - *Campus* Sobral, pela realização de quase todo o estudo experimental da tese.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

É muito bom quando todos os elementos de energia do universo: céu, terra, água, fogo e ar sempre conspiram as energias a seu favor. É muito bom quando os irmãos: inteligência, força, amizade e poesia estão sempre a seu lado. É muito bom quando se consegue admitir que estamos apenas em uma passagem para evoluirmos, e conseguimos, aos poucos, ter a consciência das nossas limitações para trabalhá-las. Agradeço à toda a divindade superior, especialmente a minha Mãe e a seu Filho, por ter me colocado em uma vida tão maravilhosa de se gerenciar, cheia de amor e de luz. Luz esta que sempre me ajudou a ver os melhores caminhos, nem sempre os mais fáceis.

Muito especialmente à minha orientadora, Prof^a Gerly Anne de Castro Brito, pelo sempre paciência e apoio, exemplo de divisão perfeita entre a ciência e o amor à família, exemplo de pesquisadora e de mulher, muito importante para a realização deste trabalho e para minha formação pessoal e científica.

À minha querida amiga Prof^a Mirna Marques Bezerra, exemplo a ser seguido de ser humano, de dedicação ao mundo científico, pela presença certa na alegria e na amenização das dores, pela sempre confiança e apoio, o meu mais profundo e sincero obrigada.

A todos os integrantes do Laboratório de Farmacologia de Sobral (LaFS), essa grande família científica que tem sido construída em alicerces profundos para assim poder crescer, sempre firmados em princípios de respeito, de trabalho, de amor e de ética, o meu muito obrigada.

Aos meus queridos colegas e amigos professores, e alunos, do Curso de Odontologia da UFC *Campus* Sobral, pela maravilhosa convivência permitindo o nosso semiárido de Sobral tornar-se fértil de virtudes, de cuidados à população e de crescimento científico e pessoal, com carinho muito especial às Prof^{as} e amigas Karine, Karuza e Delane.

Aos queridos professores Gerardo Cristino Filho e Vicente de Paulo Teixeira Pinto, pela confiança em meu trabalho e pela amizade.

Ao professor Ronaldo de Albuquerque Ribeiro, pelo acolhimento desde o início dessa caminhada científica e pelo exemplo de dedicação e trabalho.

Ao professor Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza, pelo compartilhamento das boas ideias para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao professor Rodrigo Maranguape Silva da Cunha, e todos do NUBIS (Núcleo de Biotecnologia de Sobral), especialmente ao Ricardo, pelo tranquilo acolhimento para realização de toda a biologia molecular deste trabalho.

Aos amigos do LAFICA (Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer), local onde adentrei nesse mundo científico: Mariana Vale, Renata Leitão, Rosinha, Antoniella, Pedro Soares, Ana Paula, Dani Foschetti, Carol, Angélica, Priscila, Vandinha.

Aos técnicos Júnior Lima, do Laboratório de Histopatologia de Sobral, e Josy, do NEMPI (Núcleo de Estudos e Processamento de Imagens), pela participação fundamental nesse trabalho.

Aos funcionários do doutorado em Ciências Médicas, Rita e Ivone, e de toda a UFC *Campus* Sobral, pelo apoio certo sempre que necessário.

A meus pais, amigos incondicionais, pelo eterno e imensurável amor, pela minha existência e o que dela sou.

A minha mãe, um ser divino através de quem tive a sorte de vir a esse mundo e por ela ser educada; uma mulher guerreira, em quem me espelho para continuar na caminhada da vida e conseguir o contínuo crescimento humano e espiritual.

A meu pai, um homem cheio de dons para a escrita, música, artes, letras, machetaria, lutheria, enfim, a essa pessoa admirável de quem herdei o dom para a arte de compartilhar conhecimentos.

A minha amada irmã Raíssa, amiga verdadeira, irmã maravilhosa, mulher admirável, pelo amor e apoio, e ao irmão que ganhei, meu cunhado Tarcísio, pela descontração certa nos momentos mais delicados; a vocês dois, o casal mais belo, meu muito obrigada.

A meu irmãozinho Samuel, meu anjinho, que apesar de ainda não compreender o que é um doutorado, respeita momentos de ausência para o estudo.

A minha família, em especial a meus amados avós Almira e Evangelista, Terezinha e Aprígio, pelo amor incondicional e por acreditar sempre nos frutos a serem colhidos.

“...Ainda que eu falasse a língua dos anjos e a dos homens, se eu não tivesse amor nada seria....”

(I Corintios Cap 13)

RESUMO

Disfunção temporomandibular (DTM) é um distúrbio relacionado à função do sistema mastigatório que acomete as articulações temporomandibulares (ATM), os músculos mastigatórios e/ou estruturas associadas, embora os mecanismos envolvidos na inflamação e na dor da ATM sejam pouco compreendidos. Apesar do grande interesse que hemeoxigenase-1 (HO-1) tem recebido nos últimos anos e a forte evidência dos seus efeitos citoprotetores e anti-inflamatórios, o papel da via HO-1/bilivedina (BVD)/monóxido de carbono (CO) na dor e inflamação da ATM ainda não foi estudado. O objetivo deste estudo é estabelecer um modelo experimental de hipernocicepção articular e artrite na ATM de ratos induzida por zymosan (Zy), estudar a via HO-1/BVD/CO, seu mecanismo através do guanosina monofostato cíclico (GMPc)/canal de K⁺ sensível a ATP, e sua interligação com os mediadores inflamatórios fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e interleucina-1 beta (IL-1 β). Foram utilizados ratos Wistar machos (160-220 g). Injetou-se 40 μ L de salina ou Zy (0,25; 0,5; 1 ou 2 mg) na ATM esquerda dos animais para indução de artrite. Esses animais foram sacrificados entre a 3^a h e 48^a h. Os parâmetros avaliados foram análise do limiar de hipernocicepção articular, contagem do influxo celular no lavado sinovial, estudo da permeabilidade vascular pelo extravasamento de azul de Evans, atividade de mieloperoxidase (MPO) e análise histopatológica. Os animais foram pré-tratados com hemina (indutor de HO-1; 0,1, 0,3 ou 1 mg/kg), DMDC (doador de CO; 0,025, 0,25 ou 2,5 μ mol/kg), biliverdina (produto final da via; 1, 3 ou 10 mg/kg), ZnPP IX (inibidor seletivo de HO-1; 1, 3 ou 9 mg/kg), ou com ODQ (12,5 μ mol/kg, s.c.), inibidor de guanilato cilase solúvel, ou glibenclamida (10 mg/kg, i.p.), inibidor de canal de K⁺ sensível a ATP, prévio ao DMDC 2,5 μ mol/kg. Também estudou-se a expressão gênica de HO-1, TNF α e IL-1 β no tecido mole da ATM e no gânglio trigeminal e identificaram-se esses mediadores por imunohistoquímica. Realizou-se dosagem sérica de bilirrubina e de IL-1 β no lavado sinovial. Observamos que Zy (2 mg) causou hipernocicepção articular, aumento do influxo celular no lavado sinovial, do extravasamento de azul de Evans e da atividade de MPO tempo-dependente entre a 3^a h e a 24^a h. A análise histopatológica mostrou que Zy (2 mg) induziu infiltrado celular na membrana sinovial (MS), no tecido conjuntivo periarticular, no tecido muscular esquelético e espessamento da MS na 6^a h após indução da artrite.

A partir do 10º d observaram-se crescente infiltrado celular, constituído de mononucleares, espessamento e fibrose da MS. Estimuladores da via HO-1/BVD/CO reduziram todos os parâmetros, e ZnPP IX, inibidor de HO-1, intensificou os parâmetros. Também comprovou-se o envolvimento de CO/GMPc/canal de K⁺ sensível a ATP, pois ODQ e glibenclamida reverteram a ação do DMDC. Observou-se aumento da expressão gênica e da presença de HO-1, TNF α e IL-1 β na ATM e no gânglio trigeminal, sendo condrócitos, sinoviócitos e neutrófilos, na ATM, e corpo celular do neurônio aferente primário e células satélites da glia, no gânglio trigeminal, as células que foram positivas para HO-1, TNF α e IL-1 β . Bilirrubina sérica encontrou-se aumentada, e IL-1 β foi detectada no lavado sinovial. Portanto, nossos resultados sugerem que o modelo experimental proposto é adequado ao estudo da hipernocicepção articular e da artrite na ATM, e que a via HO-1/BVD/CO/GMPc/canal de K⁺ sensível a ATP participa da fisiopatologia do processo, sendo este o primeiro trabalho a estudar esta via na hipernocicepção articular na ATM. Ademais, o balanço entre a atividade de HO-1, TNF α e IL-1 β são importantes no desenvolvimento da dor facial e da inflamação da ATM.

Palavras-chave: dor orofacial, articulação temporomandibular, zymosan, hemeoxigenase-1

ABSTRACT

Temporomandibular disorders (TMDs) encompass a group of musculoskeletal and neuromuscular conditions that involve the temporomandibular joints (TMJs), the masticatory muscles, and all associated tissues, although the mechanisms involved in the TMJ inflammation and pain are not clear. Beyond the great interest of the hemeoxygenase-1 (HO-1) and the evidence of its cytoprotector and antiinflammatory effects, the role of the pathway HO-1/bilivedin (BVD)/carbon monoxide (CO) in the TMJ inflammation and pain was not yet investigated. The purpose of the study is to propose an experimental model of articular hypernociception and TMJ arthritis induced by zymosan (Zy), to investigate the role of the HO-1/BVD/CO and its mechanisms through GMPc/ K⁺ channel ATP sensitive pathway on these events and to evaluate its relationship with TNF α and IL-1 β in rats. Inflammation was induced by intra-articular injection of zymosan (0.25, 0.5, 1 or 2mg) or saline into left TMJ. Mechanical hypernociception, cell influx, vascular permeability, myeloperoxidase activity, and histological changes were measured in TMJ lavages or tissues at selected time points. Hemin (0.1, 0.3 or 1 mg/kg), DMDC (0.025, 0.25 or 2.5 μ mol/kg), Biliverdin (1, 3 or 10 mg/kg) or ZnPP (1, 3 or 9 mg/kg) was injected (s.c.) 60 min before zymosan. ODQ (12.5 μ mol/kg; s.c.) or Glibenclamide (10 mg/kg; i.p.) was administered 1 h and 30 min prior to DMDC (2.5 μ Mol/Kg; s.c.). The gene expression for mRNA from HO-1, TNF- α and IL-1 β in the TMJ tissues and the trigeminal ganglia, and the gene expression was studied at selected time points. The level of bilirubin in plasma and the level of IL-1 β in the synovial lavage were determined. Zymosan-induced TMJ arthritis caused a time-dependent leucocyte migration, plasma extravasation, mechanical hypernociception, and neutrophil accumulation between 4 and 24 h. Histopathological analysis of TMJ of Zy injected animals showed inflammatory cell infiltration in synovial membrane (SM), in connective periarticular tissue, in skeletal muscle tissue and thickness of SM in 6 h after TMJ arthritis. Initiating on the 10th day of TMJ arthritis, it was observed continuous leucocyte infiltration, composed mainly with mononuclear cells, thickness and fibrosis of SM. Hemin (1 mg/kg), DMDC (2.5 μ mol/kg) and Biliverdin (10 mg/kg) reduced facial mechanical hypernociception, leucocyte migration, and neutrophil accumulation, confirmed by histopathological analysis. ZnPP (3 mg/kg) potentiated all the parameters. ODQ and glibenclamide reverted the antinociceptive and

antiinflammatory effects of the DMDC. It was also observed increased expression of mRNA for HO-1, TNF- α and IL-1 β in the TMJ tissues and in the trigeminal ganglia, and it was identified, through immunohistochemistry reaction, that chondrocytes, synoviocytes and neutrophils are the source of these proteins in the TMJ, and afferent neuron cell body and satellite glial cells are the source of these protein in the trigeminal ganglia. The level of bilirubin was increased in the plasma, as well as IL-1 β level in the synovial lavage. These results suggest that zymosan-induced TMJ arthritis is a reproducible model that may be used to assess both the mechanisms underlying TMJ pain and inflammation and the potential tools for therapies. Furthermore, HO-1/BVD/CO/GMPc/K⁺ channel ATP sensitive pathway participate in the physiopathological mechanisms of TMJ pain and inflammation, emphasizing that this is the first study to show this pathway on the TMJ articular hypernociception. Beyond, the balance between HO-1, TNF α and IL-1 β activity is important on the development of the TMJ pain and inflammation.

Key words: orofacial pain, temporomandibular joint, zymosan, hemeoxygenase-1

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Anatomia do complexo trigeminal no tronco encefálico.....	24
Figura 2.	Participação de células e de mediadores inflamatórios na dor orofacial.....	26
Figura 3.	Articulação temporomandibular e músculos mastigatórios.....	30
Figura 4.	Degradação do heme pela enzima hemeoxigenase (HO), gerando biliverdina, monóxido de carbono (CO) e ferro.....	36
Figura 5.	Via de síntese da HO-1 durante processo inflamatório.....	38
Figura 6.	Localização éxon-éxon dos primers desenhados para os genes alvo (TNF α , IL-1 β e HO-1).....	57
Figura 7.	Ilustração do programa utilizado na reação de qRT-PCR.....	58
Figura 8.	Curva dose-resposta da hipernocicepção articular em ratos submetidos à artrite na ATM induzida por zymosan	64
Figura 9.	Curva dose-resposta da contagem total de leucócitos do lavado sinovial da ATM de ratos submetidos à artrite induzida por zymosan	65
Figura 10.	Estudo da atividade de mieloperoxidase do tecido articular de ratos submetidos à artrite da ATM induzida por zymosan	66
Figura 11.	Estudo da atividade de mieloperoxidase do lavado sinovial na artrite da ATM de ratos induzida por zymosan	67
Figura 12.	Cinética da hipernocicepção articular em ratos submetidos à artrite na ATM induzida por zymosan	69
Figura 13.	Cinética da migração leucocitária no lavado sinovial da artrite na ATM de ratos induzida por zymosan	70
Figura 14.	Cinética da atividade de mieloperoxidase do tecido articular de ratos submetidos à artrite da ATM induzida por zymosan	71
Figura 15.	Cinética da atividade de mieloperoxidase do lavado sinovial da ATM de ratos submetidos à artrite da ATM induzida por zymosan	72
Figura 16.	Estudo do extravasamento de azul de Evans como medida da análise do aumento da permeabilidade vascular da artrite na ATM em ratos induzida por zymosan	73
Figura 17.	Fotomicrografias da análise histopatológica da ATM e de tecidos	

	periarticulares na artrite aguda	76
Figura 18.	Fotomicrografias da análise histopatológica da ATM e de tecidos periarticulares na artrite crônica	77
Figura 19.	Efeito da administração de hemina sobre a hipernocicepção articular em ratos com artrite na ATM induzida por zymosan	80
Figura 20.	Efeito da administração de DMDC sobre a hipernocicepção articular em ratos com artrite na ATM induzida por zymosan	81
Figura 21.	Efeito da administração de biliverdina sobre a hipernocicepção articular em ratos com artrite na ATM induzida por zymosan	82
Figura 22.	Efeito da administração de ZnPP IX sobre a hipernocicepção articular em ratos com artrite na ATM induzida por zymosan	83
Figura 23.	Efeito da administração de hemina sobre a contagem total de leucócitos em ratos com artrite na ATM induzida por zymosan	85
Figura 24.	Efeito da administração de DMDC sobre a contagem total de leucócitos em ratos com artrite na ATM induzida por zymosan	86
Figura 25.	Efeito da administração de biliverdina sobre a contagem total de leucócitos em ratos com artrite na ATM induzida por zymosan	87
Figura 26.	Efeito da administração de ZnPP IX sobre a contagem total de leucócitos em ratos com artrite na ATM induzida por zymosan	88
Figura 27.	Efeito da administração de hemina, DMDC e biliverdina sobre a atividade de mieloperoxidase do lavado sinovial na artrite da ATM de ratos induzida por zymosan	89
Figura 28.	Efeito da administração de ZnPP IX sobre a atividade de mieloperoxidase do lavado sinovial na artrite da ATM de ratos induzida por zymosan	90
Figura 29.	Fotomicrografias da ATM e de tecidos periarticulares do efeito da hemina, DMDC, biliverdina e ZnPP IX na artrite da ATM induzida por zymosan	93
Figura 30.	Efeito da administração de moduladores da via HO-1/CO/GMPc/canal de K ⁺ sensível a ATP sobre a hipernocicepção articular em ratos com artrite na ATM induzida por zymosan	97
Figura 31.	Efeito da administração de moduladores da via HO-1/CO/GMPc/canal de K ⁺ sensível a ATP sobre a contagem total	

	de leucócitos em ratos com artrite na ATM induzida por zymosan	98
Figura 32.	Efeito da administração de moduladores da via HO-1/CO/GMPc/canal de K ⁺ sensível a ATP sobre a atividade de mieloperoxidase do lavado sinovial na artrite da ATM de ratos induzida por zymosan	99
Figura 33.	Análise da qualidade do RNA total por gel de eletroforese obtidos de tecidos da ATM.....	101
Figura 34.	Análise da qualidade do RNA total por gel de eletroforese obtidos de tecido do gânglio trigeminal.....	102
Figura 35.	Análise da <i>Melting curve</i>	107
Figura 36.	Curva-temporal da expressão gênica relativa do RNAm para HO-1 em tecidos articulares e no gânglio trigeminal de ratos com artrite na ATM induzida por zymosan	108
Figura 37.	Curva-temporal da expressão gênica relativa do RNAm para TNF- α em tecidos articulares e no gânglio trigeminal de ratos com artrite na ATM induzida por zymosan	109
Figura 38.	Curva-temporal da expressão gênica relativa do RNAm para IL-1 β em tecidos articulares e no gânglio trigeminal de ratos com artrite na ATM induzida por zymosan	110
Figura 39.	Fotomicrografias de imunomarcção para HO-1 na ATM de ratos com artrite na ATM induzida por zymosan	112
Figura 40.	Fotomicrografias de imunomarcção para TNF α na ATM de ratos com artrite na ATM induzida por zymosan	113
Figura 41.	Fotomicrografias de imunomarcção para IL-1 β na ATM de ratos com artrite na ATM induzida por zymosan	114
Figura 42.	Fotomicrografias de imunomarcção para HO-1 no gânglio trigeminal de ratos com artrite na ATM induzida por zymosan	116
Figura 43.	Fotomicrografias de imunomarcção para TNF α no gânglio trigeminal de ratos com artrite na ATM induzida por zymosan	118
Figura 44.	Fotomicrografias de imunomarcção para IL-1 β no gânglio trigeminal de ratos com artrite na ATM induzida por zymosan	119
Figura 45.	Dosagem de IL-1 β no lavado sinovial de ratos com artrite na ATM induzida por zymosan	121

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Informação dos genes relatados e das sequências de <i>primers</i>	56
Tabela 2.	Análise histopatológica da ATM de ratos com artrite induzida por zymosan através da coloração pelo método hematoxilina-eosina (HE).....	75
Tabela 3.	Efeito da administração de hemina, DMDC, biliverdina e ZnPP IX sobre análise histopatológica da artrite na ATM de ratos induzida por zymosan através da coloração pelo método HE.....	92
Tabela 4.	Quantificação do RNA total extraído do tecido da ATM de ratos.....	103
Tabela 5.	Quantificação do RNA total extraído do gânglio trigeminal de ratos	104
Tabela 6.	Níveis séricos de bilirubina (mg/ml) em animais com artrite na ATM induzida por Zy e do grupo sham	120

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT	5-hidroxitriptamina
°C	graus Celsius
ANOVA	análise de variância
AINEs	anti-inflamatórios não esteroidais
ATM	articulação temporomandibular
BVD	biliverdina
CFA	adjuvante completo de Freund
Cg	carragenina
CGRP	peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
COX	cicloxygenase
CO	monóxido de carbono
d	dia (s)
DAB	3,3`diaminobenzidine
DMDC	decacarbonil dimanganês
DNA	ácido desoxirribonucleico
cDNA	DNA complementar
E	esquerda
EDTA	ácido etilenoaminotetracético
e.p.m.	erro padrão da média
g	grama
G	gauge
GAPDH	
GMPc	guanilato monofosfato cíclico
h	hora (s)
HE	hematoxilina-eosina
HO	hemeoxigenase
Ig	imunoglobulina
IL-1ra	antagonista do receptor de IL-1
IL-1	Interleucina 1
IL-6	interleucina-6
IL-1 α	interleucina-1 alfa

IL-1 β	interleucina-1 beta
IL-8	interleucina-8
i.art.	intra-articular
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intra-vascular
KCl	cloreto de potássio
KH ₂ PO ₄	fosfato ácido de potássio
kg	quilograma
L	litro
LTB ₄	leucotrieno B ₄
LPS	lipolissacarídeo de parede bacteriana
mg	miligrama
min	minuto
mL	mililitro
mmol	milimolar
MPO	mieloperoxidase
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo
NaCl	cloreto de sódio
NF- κ B	fator nuclear kappa B
NGF	fator de crescimento neuronal
NKA	neurocinina A
nm	nanômetro
NO	óxido nítrico
NOS _i	óxido nítrico sintase induzida
Nrf2	fator nuclear eritróide
ODQ	1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one
<i>p</i>	probabilidade
PBS	tampão fosfato
PBS-BSA	albumina sérica bovina
PG	prostaglandina
PGE ₂	prostaglandina E ₂
PMN	leucócito polimorfonuclear
qRT-PCR	<i>quantitative</i> real time PCR

q.s.p	quantidade suficiente para
RNA	ácido ribonucléico
RNA _m	RNA mensageiro
ROS	espécies reativas de oxigênio
r.p.m.	rotação por minuto
s	segundo (s)
s.c.	subcutânea
sIL-1RII	forma solúvel do receptor de IL-1 tipo II
sTNFR-I	forma solúvel do receptor de TNF α tipo I
sTNFR-II	forma solúvel do receptor de TNF α tipo II
SP	substância P
TNF α	fator de necrose tumoral alfa
ZnPP IX	zinco protoporfirina IX
Zy	zymosan

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
1.1. Dor Orofacial.....	22
1.1.1. Neurofisiologia da dor orofacial	23
1.2. Disfunção temporomandibular	27
1.2.1. Articulação temporomandibular.....	29
1.3. Mediadores envolvidos na dor e inflamação da ATM	32
1.3.1. Interleucina-1	32
1.3.2. Fator de necrose tumoral alfa	34
1.4. Via da hemeoxigenase/biliverdina/monóxido de carbono	35
1.4.1. Biossíntese e isoformas da hemeoxigenase	35
1.4.2. HO-1/biliverdina/monóxido de carbono na inflamação e na dor	37
1.4.3. HO-1/BVD/CO e artrite	40
1.5. Modelos experimentais para estudo da nocicepção articular e das alterações inflamatórias na articulação temporomandibular	42
1.6. Artrite induzida por zymosan	44
2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	45
3. OBJETIVOS	46
3.1. Objetivos gerais	46
3.2. Objetivos específicos	46
4. MATERIAL E MÉTODOS	47
4.1. Animais	47
4.2. Drogas, Soluções, Líquidos e Corantes	47
4.3. Modelo experimental de hipernocicepção articular e artrite na articulação temporomandibular induzida por zymozan	48
4.3.1. Injeção intra-articular de zymozan	48
4.3.2. Teste nociceptivo (avaliação da hipernocicepção articular)	49
4.3.3. Lavagem da ATM e coleta do lavado sinovial	49
4.3.4. Coleta da articulação temporomandibular	50
4.3.5. Coleta do gânglio trigeminal	50
4.4. Parâmetros avaliados	51
4.4.1. Hipernocicepção articular	51

4.4.2. Contagem do influxo celular no lavado sinovial	51
4.4.3. Medida do extravasamento de azul de Evans / Análise da permeabilidade vascular	51
4.4.4. Ensaio de mieloperoxidase	52
4.4.5. Análise histopatológica da ATM	52
4.5. Modulação farmacológica	53
4.5.1. Estudo da participação da via HO-1/BVD/CO na hipernocicepção articular e na inflamação da ATM induzidas por Zy	53
4.5.2. Estudo da participação de GMPc e canais de K ⁺ sensíveis a ATP no mecanismo antinociceptivo e antiinflamatório da via HO-1/CO	54
4.6. Estudo do curso-temporal da expressão do RNAm para HO-1, TNF α e IL-1 β em tecidos da ATM e do gânglio trigeminal de ratos com artrite na ATM induzida por Zy	55
4.6.1. Extração de RNA total	55
4.6.2. Quantificação por espectrofotometria e eletroforese	55
4.6.3. Síntese de cDNA	56
4.6.4. Construção dos <i>primers</i> para os genes GAPDH, HO-1, TNF α e IL-1 β	56
4.6.5. PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR)	57
4.7. Imunohistoquímica da ATM e do gânglio trigeminal para HO-1, TNF α e IL-1 β	59
4.8. Estudo dos níveis séricos de bilirrubina em ratos com artrite na ATM induzida por Zy	60
4.9. Dosagem de IL-1 β no lavado sinovial de ratos com artrite na ATM induzida por Zy	61
4.10. Análise estatística	61
5. RESULTADOS	63
5.1. Padronização de modelo experimental de hipernocicepção articular e artrite na ATM induzida por zymosan em ratos	63
5.1.1. Dose-resposta da hipernocicepção articular e da inflamação na ATM induzidas por Zy	63
5.1.2. Cinética da hipernocicepção articular e da inflamação na ATM induzidos por Zy	68
5.1.3. Estudo histopatológico da ATM de ratos com artrite induzida por	

Zymosan	74
5.2. Efeito da administração de moduladores da via HO-1/BVD/CO na hipernocicepção articular e na artrite da ATM induzidas por Zy	79
5.2.1. Efeito da hemina, DMDC, biliverdina e ZnPP IX sobre hipernocicepção articular na artrite da ATM induzida por Zy	79
5.2.2. Efeito da hemina, DMDC, biliverdina e ZnPP IX sobre o influxo celular na artrite da ATM induzida por Zy	84
5.2.3. Análise histopatológica do efeito da hemina, DMDC, biliverdina e ZnPP IX na artrite da ATM induzida por Zy	91
5.3. Estudo do envolvimento da via HO-1/CO/GMPc/canal de K ⁺ sensível a ATP na redução da hipernocicepção articular da artrite da ATM induzida por Zy	96
5.4. Análise do curso-temporal da expressão do RNAm para HO-1, TNF α e IL-1 β em tecidos da ATM e do gânglio trigeminal de ratos com artrite na ATM induzida por Zy	100
5.4.1. Extração do RNA total	100
5.4.2. Avaliação dos <i>primers</i> para os genes HO-1, TNF α , IL-1 β e GAPDH	105
5.4.3. Estudo do curso-temporal da expressão do RNAm para HO-1, TNF α e IL-1 β em tecidos da ATM e do gânglio trigeminal de ratos com artrite na ATM induzida por Zy	105
5.5. Estudo por imunohistoquímica da expressão de HO-1, TNF α e IL-1 β em tecidos articulares de ratos com artrite na ATM induzida por Zy	111
5.5.1. Estudo por imunohistoquímica da expressão de HO-1, TNF α e IL-1 β em tecidos articulares de ratos com artrite na ATM induzida por Zy	111
5.5.2. Estudo por imunohistoquímica da expressão de HO-1, TNF α e IL-1 β no gânglio trigeminal de ratos com artrite na ATM induzida por Zy	115
5.6. Estudo do nível sérico de bilirrubina em ratos com artrite na ATM induzida por Zy	120
5.7. Dosagem de IL-1 β no lavado sinovial de ratos com artrite na ATM induzida por Zy	120
6. DISCUSSÃO	123
7. CONCLUSÕES	139
REFERÊNCIAS	140

ANEXO 1	161
ANEXO 2	170
ANEXO 3	183
ANEXO 4	199

1. INTRODUÇÃO

1.1. Dor Orofacial

A dor na região oral ou craniofacial representa um grande problema de saúde uma vez que a dor é a razão principal para a procura de tratamento, sendo um importante indicador de saúde (HARGREAVES, 2011). A dor é definida 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 (MERSK, 1986). A dor orofacial, por sua vez, é descrita como toda dor associada 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 (SHINAL; FILLINGIM, 2007). Sua presença ou sua cronificação, portanto, pode comprometer a qualidade de vida dos pacientes, alterando suas atividades profissionais, afetando suas relações emocionais, sociais e familiares e implicando ainda aumento dos gastos financeiros para os serviços públicos de saúde (ALMEIDA *et al.*, 2004).

Estudos demonstraram que a dor na região orofacial atinge grande parte da população mundial, sendo a prevalência de 22% da população com mais de 18 anos relatando alguma dor na região orofacial, esses dados apenas nos EUA (LIPTON *et al.*, 1994). Já dor orofacial em sua fase crônica se encontra em cerca 10% da população adulta e mais de 50% em idosos. Nas mulheres com aproximadamente 40 anos, a dor orofacial é mais frequente do que nos homens, na relação de 2:1 (SHINAL; FILLINGIM, 2007). Diante disso, se faz mister o aprofundamento no estudo da fisiopatologia da dor orofacial na perspectiva de diagnóstico mais acurado e de terapêuticas mais eficazes.

1.1.1. Neurofisiologia da dor orofacial

As dores orofaciais são transmitidas através de impulsos nociceptivos levados da periferia ao SNC principalmente por meio do V par de nervos cranianos, o nervo trigêmio, mas também carregado por outras estruturas nervosas como nervo facial (VII par), nervo glossofaríngeo (IX par), nervo vago (X par) e nervos cervicais superiores (SESSLE, 2000).

Os nociceptores, que se encontram na pele, músculos, articulações, vasos sanguíneos e vísceras atuando na integridade do corpo, realizam a transdução do estímulo a potenciais bioelétricos que serão conduzidos pelos neurônios aferentes primários, especificamente fibras A δ e C. Sabe-se que as fibras mielinizadas A δ conduzem sinais de forma rápida (dor aguda), enquanto as fibras C amielínicas apresentam condução lenta destes impulsos (dor lenta; queimação), esta última respondendo a uma ampla variedade de estímulos (mecânicos, químicos, térmicos ou isquêmicos) (MATTHEWS; SESSLE, 2002; OKESON, 2003).

As fibras aferentes primárias conduzirão esse impulso elétrico ao complexo trigeminal na região da ponte do tronco encefálico, local onde há sinapse com neurônio de segunda ordem, visto ser o nervo trigêmio o principal responsável pela nocicepção articular. À semelhança do que ocorre na medula espinhal, em que há o gânglio sensitivo da raiz dorsal da medula espinhal, o corpo celular desse neurônio aferente primário se encontra no gânglio sensitivo trigeminal situado no cavo trigeminal do osso temporal na base do crânio (MATTHEWS; SESSLE, 2002; OKESON, 2003).

O complexo trigeminal do tronco encefálico é dividido anatômica e funcionalmente em núcleo sensorial principal, núcleo motor e núcleo do trato espinal, o qual compreende três subnúcleos: oral, interpolar e caudal (**Figura 1**). O núcleo motor está envolvido nas respostas motoras. O núcleo sensitivo principal é o local de transmissão das sensações de tato e propriocepção, fazendo parte da via epicrítica somestésica trigeminal. O trato espinal do trigêmio, com seus 3 subnúcleos, é o local de transmissão das sensações de dor, temperatura e pressão fazendo parte da via protopática somestésica trigeminal (SESSLE, 1999; OKESON, 2003). Baseado em observações morfológicas, comportamentais, clínicas e eletrofisiológicas, o subnúcleo caudal é o principal local de transmissão da informação nociceptiva da região orofacial no tronco cerebral, sendo análogo ao corno dorsal da medula

espinhal para transmissão das informações nociceptivas das demais parte do corpo (SESSLE, 1999). Além disso, Sessle (2000) observou também que lesões do subnúcleo caudal em animais experimentais reduziram as respostas comportamentais, as de reflexos musculares e as autônomas, aos estímulos nocivos aplicados à face.

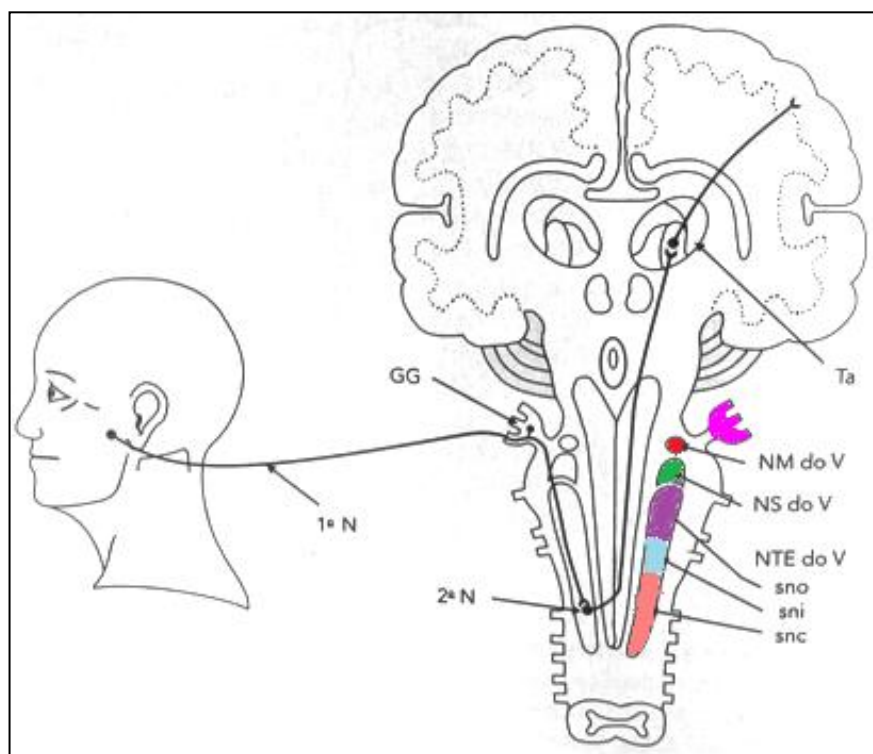


Figura 1. Anatomia do complexo trigeminal no tronco encefálico. GG: Gânglio trigeminal, NM do V: núcleo motor do complexo trigeminal, NS do V: núcleo sensitivo principal do complexo trigeminal, NTE do V: núcleo do trato espinhal do complexo trigeminal, sno: subnúcleo oral, sni: subnúcleo interpolar, snc: subnúcleo caudal, Ta: tálamo. Fonte: Adaptado de OKESON, 2003.

A partir do subnúcleo caudal do trato espinhal do trigêmeio, principalmente, a informação nociceptiva será levada por neurônios de segunda ordem como neurônios nociceptivo específico (SN) e de variação dinâmica ampla (WDR) que ascenderão pelos tratos trigeminotalâmicos ao tálamo. Antes de a informação nociceptiva ascender ao tálamo e córtex cerebral, há a modulação tanto para suprimir quanto para amplificar a informação nociceptiva nos terminais centrais das fibras aferentes (SESSLE, 2000). Esse sistema modulador é composto 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 espinhal (MATTHEWS; SESSLE, 2002; OKESON, 2003). Para a supressão podem ser liberados peptídeos opióides endógenos como endorfinas, encefalinas e dinorfinas que atuam em receptores opióides, assim como há a liberação de serotonina, ácido γ -aminobutírico (GABA), glicina e dopamina inibindo a passagem do impulso nociceptivo. Para a facilitação, entretanto, pode haver liberação de neurotransmissores estimulatórios como glutamato e aspartato atuando em receptores NMDA e AMPA, ATP em receptores P2X e norepinefrina atuando em receptores alfa-adrenérgicos presentes nos neurônios centrais (MATTHEWS; SESSLE, 2002; OKESON, 2003; VANEGAS; SCHAIBLE, 2004).

A informação nociceptiva chega então ao tálamo (núcleos talâmicos sensitivos), de onde partem aferências para o córtex somestésico, local onde a intensidade e a localização serão processadas, e, juntamente com as informações advindas do córtex somestésico secundário e do sistema límbico, darão um significado à sensação sendo percebida como dor. Em conexões com o sistema límbico (amígdala, hipotálamo, hipocampo, giro do cíngulo) há o desencadeamento do componente emocional da dor, que gera ao paciente o sofrimento e a busca pelo tratamento, sendo apresentado ao clínico através do comportamento doloroso, que provoca todas as consequências sócio-econômico-emocionais das dores orofaciais (MATTHEWS; SESSLE, 2002; OKESON, 2003).

A partir do momento em que a dor passa de uma função de alerta para se tornar patológica, ocorrem alterações da via nociceptiva que caracterizam a fisiopatologia da dor como sensibilização periférica, hiperexcitabilidade dos interneurônios do SNC, sensibilização central, neuroplasticidade, descargas ectópicas, acoplamento simpático-sensitivo e redução ou perda do controle inibitório descendente (SESSLE, 2005a, 2005b).

Participando desse processo, sabe-se também que células da glia, tanto no gânglio trigeminal quanto no trato espinal do trigêmio, além de promoverem suporte metabólico e estrutural, modulam a excitabilidade neuronal através de mediadores como neuropeptídeos, NO, citocinas, glutamato e ATP contribuindo na fisiopatologia da dor periférica e central. Essa conexão com os neurônios ocorre através de junções tipo GAP, que são canais formados por conexinas, podendo, dessa forma, modular a atividade neuronal (CHIANG *et al.*, 2011).

Sabe-se que 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)), gasosos (óxido nítrico (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 apenas de sensibilizar esses receptores (**Figura 2**) (NOGUSHI; OKUBO, 2011; VERRI-JUNIOR *et al.*, 2006).

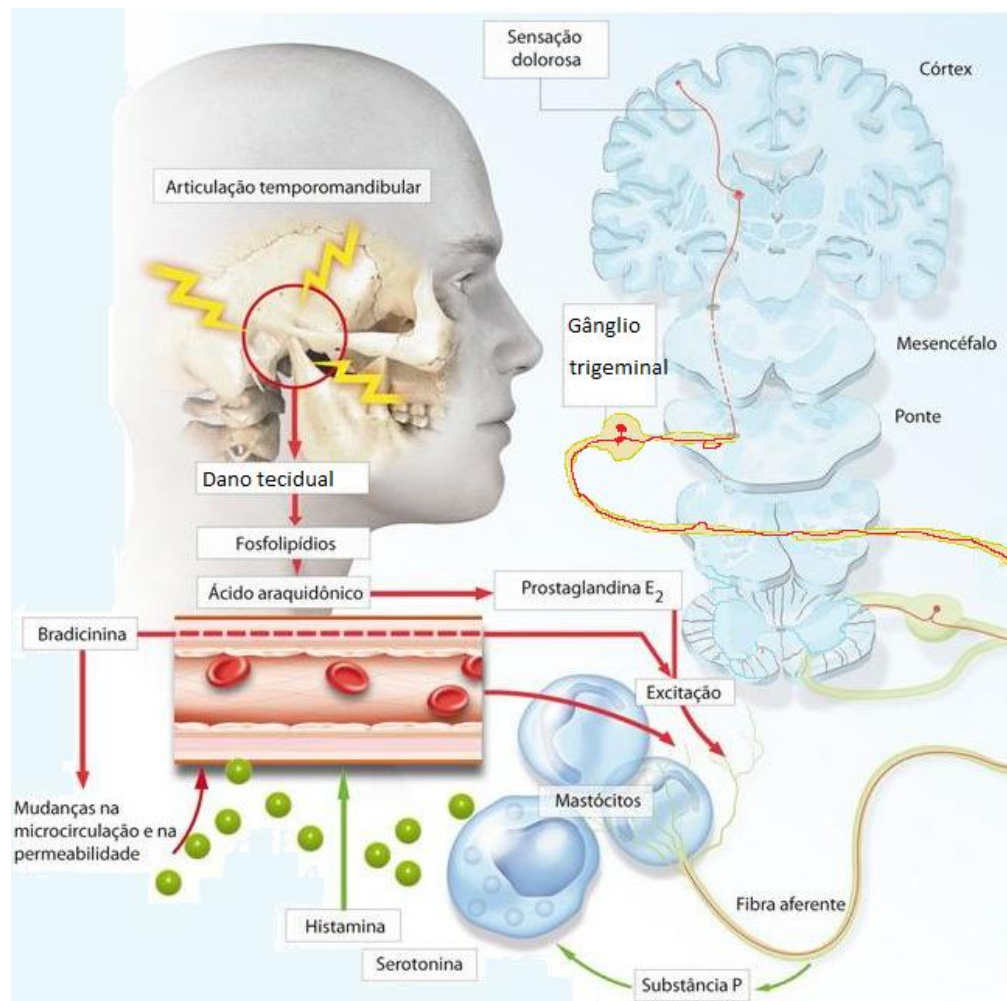


Figura 2. Participação de células e de mediadores inflamatórios na dor orofacial. Fonte: Adaptado de OKESON, 1998.

1.2. Disfunção temporomandibular

Disfunção temporomandibular (DTM) foi inicialmente denominada Síndrome de Costen em 1934, identificada por um otorrinolaringologista, ao descrever um grupo de sintomas situados ao redor do ouvido e na ATM, sendo denominada DTM em 1982 (COSTEN, 1934). De acordo com a última revisão da Associação Americana de Dor Orofacial, em 2010, foi reconhecido que as DTMs englobam um grupo de condições musculoesqueléticas e neuromusculares que envolvem as ATMs, os músculos da mastigação e todos os tecidos associados. Os sinais e sintomas relacionados com esses transtornos são diversos, e podem incluir dificuldades na mastigação, fala e outras funções orofaciais. Além disso, os sintomas estão também associados com a dor aguda ou persistente, e os pacientes muitas vezes sofrem de outros distúrbios dolorosos (comorbidades). As formas crônicas da dor podem levar à ausência ou insuficiência de trabalho ou interações sociais, resultando em uma redução na qualidade de vida (GREENE *et al.*, 2010).

De fato, dor nas estruturas articulares e musculares, em repouso e durante movimentos mandibulares, é um dos mais importantes sintomas de pacientes com DTM e uma fonte comum de dor orofacial crônica. Trabalhos têm relatado que a inflamação articular exerce o papel de sensibilizar nociceptores, causando hiperalgesia, 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 (SESSLE; YU, 1991; YU *et al.*, 1995; TAKEUCHI *et al.*, 2004; TAKEDA *et al.*, 2006). A dor pode estar acompanhada de ruídos articulares como estalido e crepitação. Os sintomas associados às DTMs podem incluir cefaleia secundária, dor cervical, sintomas otológicos como zumbido, otalgia, barohipoacusia e distúrbios do sono (CIANCAGLINI; RADAELLI, 2001; LAM *et al.*, 2001; YATANI *et al.*, 2002).

Dados epidemiológicos sugerem que cerca de 6 a 12 % da população apresenta sintomas de DTM, e que são gastos por ano cerca de 10 bilhões de dólares no tratamento desta desordem nos Estados Unidos (EUA) (MILAM, 2003). No Brasil, foi encontrado pelo menos um sintoma de DTM em 39,2 % da população, e relato de dor na ATM em 25,6 % da população, ressaltando sempre uma maior prevalência pelo sexo feminino (GONÇALVES *et al.*, 2010).

De acordo com a última classificação da Associação Americana de Dor Orofacial (AAOP), as DTMs podem ser classificadas em articulares e musculares. As disfunções musculares incluem mialgia local, miosite, mioespaço, mialgia centralmente mediada, contratura miofibrótica e dor miofascial. As disfunções articulares incluem desordens congênitas ou de desenvolvimento, fratura do côndilo, anquilose, deslocamento da ATM, condições não inflamatórias como osteoartrites, condições inflamatórias como sinovite/capsulite e poliartrites, e deslocamento do disco com redução e sem redução (DE LEEUW, 2008). Na tentativa de padronizar os estudos clínicos, foi desenvolvido também o RDC/TMD (*Research Diagnostic Criteria for Temporomandibular Disorders*) que inclui um duplo eixo de classificação envolvendo as condições físicas e os fatores psicológicos associados, questionário esse que se encontra em fase modificação (DWORKIN; LERESCHE, 1992). O diagnóstico diferencial, portanto, é mister para o correto tratamento a fim de proporcionar ao paciente alívio da dor e reabilitação de sua condição física, emocional e laboral.

As DTMs apresentam etiologia multifatorial tendo como fatores de risco traumas na região de face e pescoço; hábitos parafuncionais como mascar chicletes, onicofagia, hábito de morder objetos e bruxismo; hábitos posturais e hábitos ocupacionais como o uso contínuo do telefone por telefonistas e músicos com instrumento de sopro ou instrumento com apoio na mandíbula (ISRAEL *et al.*, 1999; MANFREDINI *et al.*, 2003). Problemas psicológicos, ansiedade, depressão e estresse também têm grande correlação (SCHNURR *et al.*, 1990; MADLAND *et al.*, 2000). Envolvimento de alterações sistêmicas relacionadas primariamente com doenças reumatológicas, como esclerose sistêmica, polimiosite, dermatomiosite, espondilite anquilosante, gota, condrocalcinose e desordens autoimunes (síndrome de Sjögren), artrite reumatóide e lúpus eritematoso sistêmico, assim como fibromialgia, são importantes de serem investigadas durante anamnese dos pacientes (FREDRIKSSON *et al.*, 2003; SMYTHE, 2005).

As modalidades de tratamento incluem terapias com placas oclusais, terapias físicas (termoterapia, laser, estimulação elétrica neural transcutânea-TENS), terapia com exercícios, farmacoterapia, terapia cognitiva, acupuntura e procedimentos cirúrgicos como artroscopia, artrocentese, reposicionamento de disco e regularização das superfícies articulares (JUNG *et al.*, 2011; CRAANE *et al.*, 2012;

LIU *et al.*, 2012). Essas terapêuticas têm mostrado bons resultados, porém o controle da dor ainda precisa ser melhor trabalhado.

1.2.1. Articulação temporomandibular

As articulações temporomandibulares (ATM) são componentes do sistema estomatognático constituído também pela musculatura facial, dentes, periodonto, mucosa jugal, língua, glândulas, nervos e vasos sanguíneos. Esses componentes, em conjunto, desempenham importantes funções para a sobrevivência e para as relações sociais dos indivíduos como mastigação, deglutição, respiração, fala e expressão facial. Caso alguma dessas estruturas esteja acometida funcional ou patologicamente, tal alteração trará problemas funcionais e prejudicará sobremaneira a qualidade de vida desses indivíduos (SIQUEIRA; TEIXEIRA, 2012).

Essa articulação é uma das mais complexas articulações do corpo sendo classificada como uma articulação gínglimo artroidal ao realizar movimentos de dobradiça e de deslize, respectivamente; tendo origem embriológica do 1º arco branquial (ÖGÜTCEN-TOLLER; KESKIN, 2000). Diferencia-se das demais articulações do corpo pelo fato de as duas ATMs, direita e esquerda, funcionarem simultaneamente; de possuir um ponto rígido ao final do movimento, os dentes, e de apresentar metabolismo diferenciado. Trabalha em conjunto com os músculos mastigatórios masseter, temporal, pterigóideo medial, pterigóideos lateral superior e inferior, supra e infra-hióideos para realizar os movimentos excursivos mandibulares de abertura, fechamento, protrusão e lateralidade direita e esquerda e assim exercer as funções do sistema mastigatório (RATCLIFF *et al.* 1998; ALOMAR *et al.*, 2007).

Está localizada à frente do ouvido e é formada anatomicamente pela cabeça da mandíbula articulando na fossa mandibular do osso temporal, estruturas estas recobertas por cartilagem articular que exercem funções de facilitar o funcionamento dessas estruturas ósseas com o disco articular e de reduzir cargas pontuais sobre o osso subjacente (**Figura 3**). A cartilagem articular é constituída de fibras de colágeno (tipos II, IX e XI) e de condrócitos. Além disso, apresenta grande quantidade de proteoglicanos e glicosaminoglicanos, que contribuem para flexibilidade da cartilagem e proteção de seus constituintes contra a ação mecânica originada da compressão, cisalhamento e alongamento de cargas nas articulações (KURODA *et al.*, 2009).

Anatomia da ATM

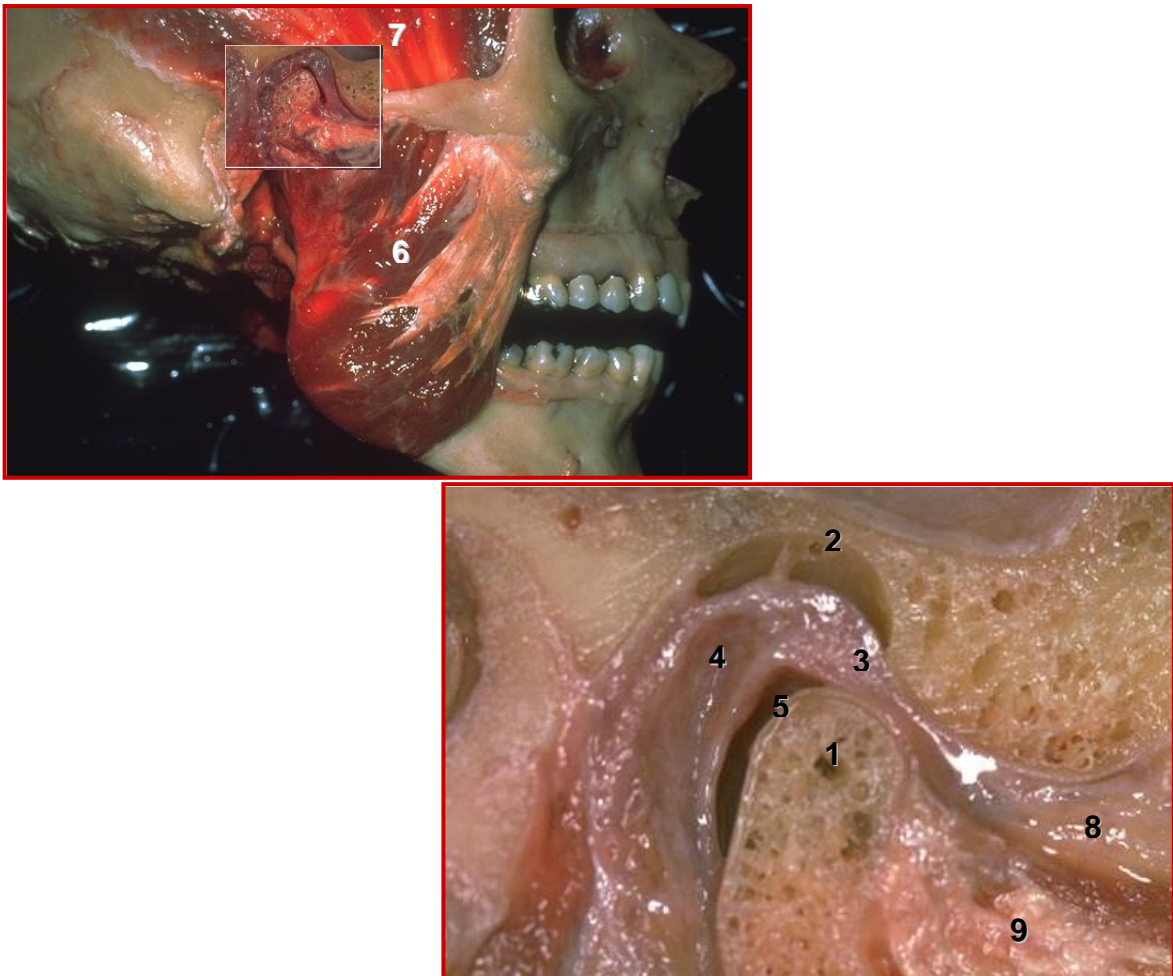


Figura 3. Articulação temporomandibular e músculos mastigatórios. 1. cabeça da mandíbula, 2. fossa mandibular do osso temporal, 3. disco articular, 4. zona retrodiscal, 5. cartilagem articular, 6. músculo masseter, 7. músculo temporal, 8. músculo pterigóideo lateral superior, 9. músculo pterigóideo lateral inferior. Fonte: cedido por Prof. Terry Tanaka.

O disco articular, avascular e sem inervação, se encontra interposto entre as duas estruturas ósseas com as funções de amortecer e distribuir pressões durante os movimentos; preencher os espaços intra-articulares, compensando as irregularidades ósseas; estabilizar os côndilos nas suas posições e movimentos funcionais e proteger a cartilagem articular e o osso subcondral. O disco articular é constituído por uma matriz fundamental composta de fibras colágenas e proteoglicanos, com as glicosaminoglicanas principalmente alocadas na porção

central, com condrócitos em sua intimidade. Insere-se na cápsula articular anterior e posteriormente, sendo a região posterior denominada zona bilaminar ou retrodiscal. Essa região apresenta dois estratos, o superior, composto de fibras elásticas, e o inferior, composto de fibras colágenas, sendo a única estrutura capaz de tracionar posteriormente o disco articular, caracterizando-se por ser ricamente inervada e vascularizada e, portanto, fonte importante de dor nas disfunções temporomandibulares (DTM) que envolvam a ATM (FUJITA; HOSHINO, 1989; ALOMAR *et al.*, 2007; WILLARD *et al.*, 2012).

Os ligamentos articulares como cápsula articular, ligamento temporomandibular, ligamentos colaterais mediais e laterais e ligamento mandíbulo ou disco-maleolar, participam da função articular ao limitar de forma passiva os movimentos excursivos mandibulares tanto mecanicamente quanto através de atividades reflexas neuromusculares (ALOMAR *et al.*, 2007).

A presença do lavado sinovial, produzido, secretado e reabsorvido pela membrana sinovial situada na superfície interna da cápsula articular, é muito importante, pois lubrifica as superfícies articulares, nutre as células do disco articular e da cartilagem articular e atua na defesa local ao apresentar células como linfócitos e macrófagos. A membrana sinovial, assim denominada, não constitui verdadeiramente uma membrana, pois é composta de uma a três camadas de células sinoviais, a citar sinoviócitos tipo A ou macrófagos-símile e sinoviócitos tipo B ou fibroblastos-símile, soltas em uma matriz fundamental composta de proteoglicanos, tendo as 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, apenas uma estrutura símile (laminina), e o epitélio dos capilares ainda são fenestrados (SHIBATA *et al.*, 1998, NOZAWA-INOUE *et al.*, 1998, 2003).

O equilíbrio entre os níveis das enzimas metaloproteinases (MMP), que degradam proteoglicano e colágeno da matriz cartilaginosa, e do fator tecidual inibidor das metaloproteinases (TIMP) regula a remodelação tecidual em condições fisiológicas. O desequilíbrio entre os níveis dessas enzimas são fatores importantes para o desenvolvimento de processos degenerativos articulares (KUBOTA *et al.*, 1997,1998; SHINODA; TAKAKU, 2000; MIZUI *et al.*, 2001).

1.3. Mediadores envolvidos na dor e inflamação da ATM

Pesquisas clínicas e experimentais sobre patogênese e mediadores envolvidos na dor, na inflamação e em processos degenerativos da articulação temporomandibular (ATM) vêm sendo desenvolvidas nessas duas últimas décadas. Alguns mecanismos já foram propostos, mas não se tem ainda uma total compreensão de como se desencadeiam esses processos (CAIRNS, 2010). Citocinas como interleucina-1 beta (IL-1 β), fator de necrose tumoral alfa (TNF α), interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8), e outros mediadores como serotonina (5-HT), neuropeptídeos, prostaglandinas (PGs) como PGE₂, leucotrienos (LTs), imunoglobulinas e ATP atuando em receptores P2X3 e P2X2/3 já foram descritos como importantes no desencadeamento desse processo (ALSTERGREN *et al.*, 1995; QUINN *et al.*, 2000; YAMAZA *et al.*, 2003; KANEYAMA *et al.*, 2002; 2005a; 2005b; FREDRIKSSON *et al.*, 2005; CHANG; ISRAEL, 2005; RODRIGUES *et al.*, 2006; KYRKANIDES *et al.*, 2007; TEIXEIRA *et al.* 2010a, 2010b; VERNAL *et al.*, 2008). A prostaglandina PGJ₂, assim como óxido nítrico (NO) e os receptores opióides μ e κ atuam na inibição da dor inflamatória na ATM (CHICRE-ALCÂNTARA *et al.*, 2012; QUINTEIRO *et al.*, 2012). Enfocaremos as duas citocinas com as quais trabalhamos em nosso estudo.

1.3.1. Interleucina-1

Interleucina-1 é produzida em grandes quantidades pela membrana sinovial durante a inflamação, assim como por monócitos e macrófagos, não estando presente em tecidos normais (DINARELLO; WOLFF, 1993; TATAKIS, 1993). Consiste numa família de IL-1 α , IL-1 β e antagonista do receptor de IL-1 (IL-1ra), de forma que IL-1 α normalmente permanece no citosol enquanto IL-1 β e IL-1ra são secretados (DINARELLO, 1998). Foi encontrada pela primeira vez em 1982 no fluido sinovial de articulações de joelhos de pacientes com artrite reumatóide (AR), impulsionando o desenvolvimento de muitas pesquisas a partir da coleta do lavado sinovial articular (KOPP, 1998).

Sandler *et al.* (1998) e Shinoda e Takaku (2000) sugeriram não haver relação entre IL-1 β e alterações inflamatórias como sinovite e processo degenerativo

intra-articular. Kubota *et al.* (1997), entretanto, mostraram haver relação entre a presença de IL-1 β e o desenvolvimento de osteoartrite na ATM. Alstergren *et al.* (1998; 1999), Suzuki *et al.* (2002), Matsumoto *et al.* (2006) e Vernal *et al.* (2008) observaram aumento da dosagem de IL-1 β em ATMs acometidas por processo inflamatório quando comparado a articulações normais, e sugeriram relação entre IL-1 β e sintomatologia dolorosa, limitação nos movimentos mandibulares e desarranjos internos articulares. Ijima *et al.* (2001) demonstraram que também IL-1 α é capaz de induzir síntese de MMPs por condrócitos e células do disco articular. Tominaga *et al.* (2004) reafirmaram a participação de IL-1 β na patogênese das DTMs, assim como Nishimura *et al.* (2004) ao mostrar que, nos casos de insucesso na realização de artrocentese, IL-1 β e IL-6 continuavam presentes no lavado sinovial articular. Experimentalmente, foi detectada IL-1 β no lavado sinovial da ATM na artrite induzida por antígeno (albumina) (TOMINAGA *et al.*, 2001; QUINTEIRO *et al.*, 2012) e por carragenina (DENADAI-SOUZA *et al.*, 2009).

Estudos sugerem que IL-1 β sensibiliza nociceptores e causa hiperalgesia, devendo atuar na fisiopatologia da dor articular advinda da ATM (WATKINS *et al.*, 1994; ALSTERGREN *et al.*, 1998, 2003). Exerce também as funções de ativar sinoviócitos tipo B (fibroblastos-símile) a estimular a síntese de outras citocinas como IL-6, IL-8 e de estimular a produção de PGs, exercendo seu papel fundamental na amplificação e na perpetuação da resposta inflamatória articular (OGURA *et al.*, 2002; TOBE *et al.*, 2002; OGURA *et al.*, 2009; SATOH *et al.*, 2009).

Sabe-se que seu efeito na destruição articular é devido a sua capacidade de ativar condrócitos, células do disco articular, células da cartilagem articular e sinoviócitos tipo B (fibroblastos-símile) a produzirem MMPs, assim como de inibir síntese de proteoglicanos e colágeno tipo 2, e de ativar osteoclastos. IL-1 β também estimula a proliferação de fibroblastos e a metaplasia de condrócitos a células fibroblastos-símile. IL-1 β , portanto, deve estar envolvida no processo de destruição articular, formação do *pannus*, desenvolvimento de aderências e adesões e anquilose da ATM (MARTEL-PELLETIER *et al.*, 1991; KUBOTA *et al.*, 1997; SASAKI *et al.*, 1998; KOPP, 1998; ALSTERGREN *et al.*, 1998, 2000; IJIMA *et al.*, 2001; SUZUKI *et al.*, 2002; OGURA *et al.*, 2002; GE *et al.*, 2011).

Existem também fatores protetores produzidos localmente na tentativa de conter o processo inflamatório. Fang *et al.*, em 1999, encontraram antagonista do

receptor de IL-1 β (IL-1ra) em ATMs com osteoartrite. Alstergren *et al.* (2003) e Tominaga *et al.* (2004) detectaram a presença de IL-1ra e de forma solúvel do receptor de IL-1 tipo II (sIL-1RII) no fluido sinovial da ATM de pacientes com poliartrite, e no lavado sinovial da ATM de pacientes com osteoartrite, respectivamente. Uma elevada produção de IL-1ra e sIL-1RII, ambos com ação anti-inflamatória, está relacionada à proteção da destruição óssea e cartilaginosa e da dor por inibirem a ação de IL-1 β (FANG *et al.*, 1999; ALSTERGREN *et al.*, 2003; TOMINAGA *et al.*, 2004).

1.3.2. Fator de necrose tumoral alfa

Fator de necrose tumoral alfa (TNF α) é produzido pela membrana sinovial da ATM durante a inflamação, assim como por monócitos e macrófagos ativados, e parece ser responsável pela inflamação sistêmica na artrite reumatóide (ALSTERGREN, 2000). Encontra-se presente na sinóvia, no lavado sinovial e no pannus de pacientes com AR (CHU *et al.*, 1991; DELEURAN *et al.*, 1992).

Sabe-se que TNF α exerce funções de ativar linfócitos, de estimular a síntese de outras citocinas como IL-1 β e IL-6, de estimular a produção de PGs em sinoviócitos tipo B (fibroblastos-símile), o que estimula a síntese de colagenases e ativa osteoclastos (CUNHA *et al.*, 1992; ALSTERGREN, 2000; EMSHOFF *et al.*, 2002; OGURA *et al.*, 2005; KE *et al.*, 2007).

Foram encontrados níveis elevados de TNF α em ATMs sintomáticas quando comparados a articulações normais (SHAFER *et al.*, 1994; NORDAHL *et al.*, 2000; EMSHOFF *et al.*, 2000). TNF α provavelmente atua na sensibilização de nociceptores indiretamente, por desencadear o aumento da produção de IL-1 β , exercendo papel importante nos processos de hiperalgesia e alodinia participando da fisiopatologia da dor articular da ATM (NORDAHL *et al.*, 2000).

Sandler *et al.* (1998), entretanto, sugeriram não haver relação entre níveis de TNF α e processo degenerativo intra-articular. No entanto, autores como Fu *et al.* (1995), Emshoff *et al.* (2000), Kaneyama *et al.* (2002) e Vernal *et al.* (2008) discutiram que TNF α está envolvido na etiopatogênese da sinovite e da degeneração cartilaginosa em pacientes com DTM. Suzuki *et al.* (2002) e Matsumoto *et al.* (2006) afirmaram que TNF α participa também da etiopatogênese de

desarranjos internos articulares. Experimentalmente, foi detectado $TNF\alpha$ no lavado sinovial e em tecidos da ATM na artrite induzida por antígeno (albumina) (SUKEDAI *et al.*, 2004; HIROTA *et al.*, 2006; QUINTEIRO *et al.*, 2012) e por carragenina (DENADAI-SOUZA *et al.*, 2009).

Inibidores biológicos de $TNF\alpha$, as formas solúveis de seus receptores tipos I e II (sTNFR-I e sTNFR-II), são também importantes na fisiopatologia das DTMs. Em pacientes com DTM e osteoartrite, níveis elevados desses receptores foram detectados no fluido sinovial em maiores concentrações do que em ATMs normais, sugerindo que o balanço entre $TNF\alpha$ e seus inibidores sTNFR-I e sTNFR-II é importante para a inibição da progressão da doença (UEHARA *et al.*, 2004; KANEYAMA *et al.*, 2005a, 2005b).

1.4. Via da hemeoxigenase/biliverdina/monóxido de carbono

1.4.1. Biossíntese e isoformas da hemeoxigenase

A hemeoxigenase (HO) foi originalmente identificada em 1969 por Tenhunen *et al.* que caracterizaram a atividade da enzima, assim como sua localização celular. A HO é uma enzima microssomal que catalisa a degradação do heme em monóxido de carbono (CO), biliverdina (BVD) e ferro (ABRAHAM *et al.*, 1988). Uma vez que o grupo heme em sua forma livre é potencialmente tóxico para a célula, por estimular a produção de radicais livres, aumentar a 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). A oxidação do heme requer NAD(P)H ferrihemoproteína redutase (NAD(P)H-citocromo P-450 redutase) e a presença de oxigênio, assim como NAD(P)H. Na maioria dos mamíferos, BVD é reduzida a bilirrubina pela biliverdina redutase, enquanto o ferro livre produzido durante a degradação do heme é sequestrado pela ferritina (**Figura 4**).

Três isoformas da HO (HO-1, HO-2 e HO-3) foram identificadas (MAINES *et al.*, 1988; MCCOUBREY *et al.*, 1997). A ativação de HO-1, a forma induzida da HO, resulta em redução do dano oxidativo e apoptose, reduzindo eventos inflamatórios como edema, migração celular e produção de citocinas pró-

inflamatórias (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).

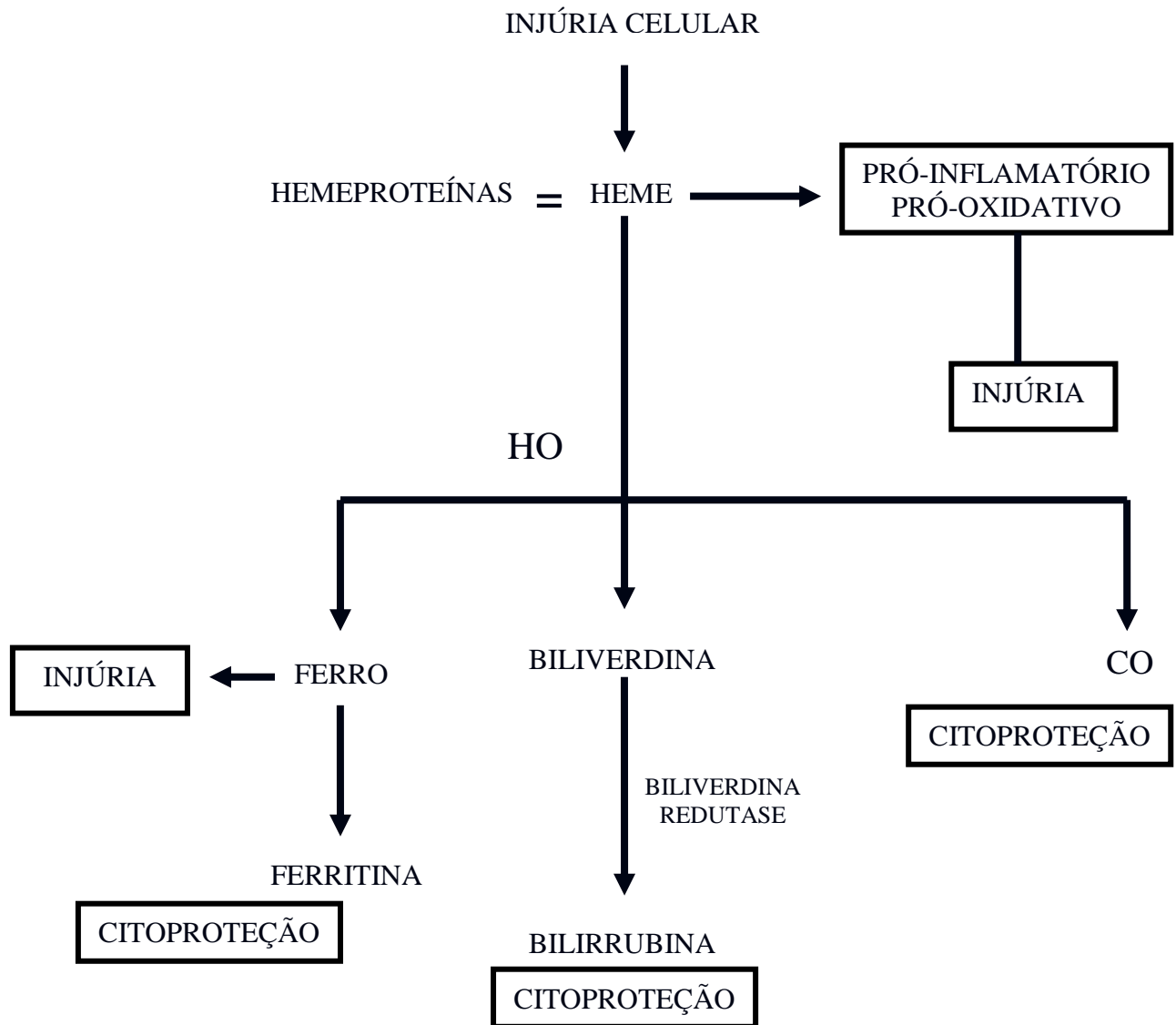


Figura 4. Degradação do heme pela enzima hemeoxigenase (HO), gerando biliverdina, monóxido de carbono (CO) e ferro. Biliverdina é rapidamente convertida em bilirrubina pela biliverdina redutase. O ferro é capturado pela ferritina. Os produtos de degradação do heme pela HO possuem várias propriedades fisiológicas (WAGENER *et al.*, 2003).

Enquanto a HO-1 é estruturalmente diferente de suas isoformas, HO-2 e HO-3 são muito similares (cerca de 90 % de homologia), com a HO-3 apresentando

pobre atividade de degradação de heme. Constitutivamente expressa, a HO-2 foi identificada nos rins, músculo liso vascular, fígado, cérebro e baço (WUNDER; POTTER, 2003). Embora ambas isoenzimas, HO-1 e HO-2, degradem heme numa extensão similar e levem à geração dos mesmos produtos, foram demonstradas diferenças significantes entre as duas isoformas. Sob condições normais a atividade da HO-2 supera em 2-3 vezes a atividade da HO-1 (TRAKSHEI *et al.*, 1986). Entretanto, a atividade da HO-1 pode aumentar em até 100 vezes quando exposta a metais pesados e condições de estresse como hipóxia, hipertermia, dano celular, respondendo pela maior parte do catabolismo do heme e gerando produção de CO e BVD (TRAKSHEL *et al.*, 1986).

Ressalta-se que parece não existir outra enzima que responda à tamanha variedade de estímulos. Com base nestas observações foi sugerido que a indução da HO-1 representa, pelo menos em parte, um mecanismo de defesa. A saber, a maioria dos camundongos que sofreram deleção gênica da HO-1 não sobreviveram após o nascimento, e aqueles que sobreviveram apresentaram retardo no crescimento e anemia normocrômica, morrendo dentro do primeiro ano de vida (POSS; TONEGAWA, 1997). Ainda, a análise histopatológica revelou que os rins e o fígado desses animais apresentaram deposição de ferro e demonstraram intensa reação inflamatória caracterizada por hepatoesplenomegalia e leucocitose. Além disso, em 2002, foi descrito na literatura o primeiro caso de deficiência da expressão da HO-1 em humanos. Esse indivíduo apresentava alterações semelhantes às aquelas observadas nos animais deficientes de HO-1, incluindo retardo do crescimento, anemia, leucocitose e sensibilidade aumentada ao estresse oxidativo (KAWASHIMA *et al.*, 2002).

1.4.2. HO-1/biliverdina/monóxido de carbono na inflamação e na dor

Vários estudos vêm demonstrando que a HO-1, seu substrato heme e seus produtos, CO e BVD, são capazes de modular o processo inflamatório. HO-1 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 (BAKKEN *et al.*, 1972; CAMHI *et al.*, 1995; DOI *et al.*, 1999; YACHIE *et al.*, 2003). Essa variedade de estímulos à expressão de HO-1 parece ser devido ao

fato de que sua expressão é controlada por um grande número de fatores de transcrição, incluindo fator NF- κ B (fator nuclear κ B) via PI3K (proteína quinase específica de serina) e alguns membros da família MAPK (sigla em inglês para proteína quinase ativada por mitógeno) como quinases ativadas por estresse ou quinases regulada por sinais extra-celulares (ERK) (**Figura 5**) (GERALDES *et al.*, 2008). Outro fator de transcrição importante para a expressão gênica de HO-1 é o Nrf2 (*nuclear factor erythroid 2-related factor 2*), conferindo proteção contra o estresse oxidativo e levando à inibição da produção de citocinas (ALAM; COOK, 2003; PARK *et al.*, 2010; WRUCK *et al.*, 2011), assim como o AP-1 (proteína ativadora-1) (CAMHI *et al.*, 1995). Igualmente importante em condições de hipóxia, há o fator de transcrição 1α induzido por hipóxia (HIF-1 α) para regular a expressão de HO-1 diante dessa condição (LEE *et al.*, 1997).

De forma semelhante com que os estímulos induzem a síntese de HO-1 via fatores de transcrição gênica, HO-1 também parece atuar sobre fatores de transcrição como NF- κ B, AP-1 e EGR-1 (*early growth response-1*), inibindo-os, para exercer suas ações (MEGIAS *et al.*, 2009; PARK *et al.*, 2010; CHI *et al.*, 2012).

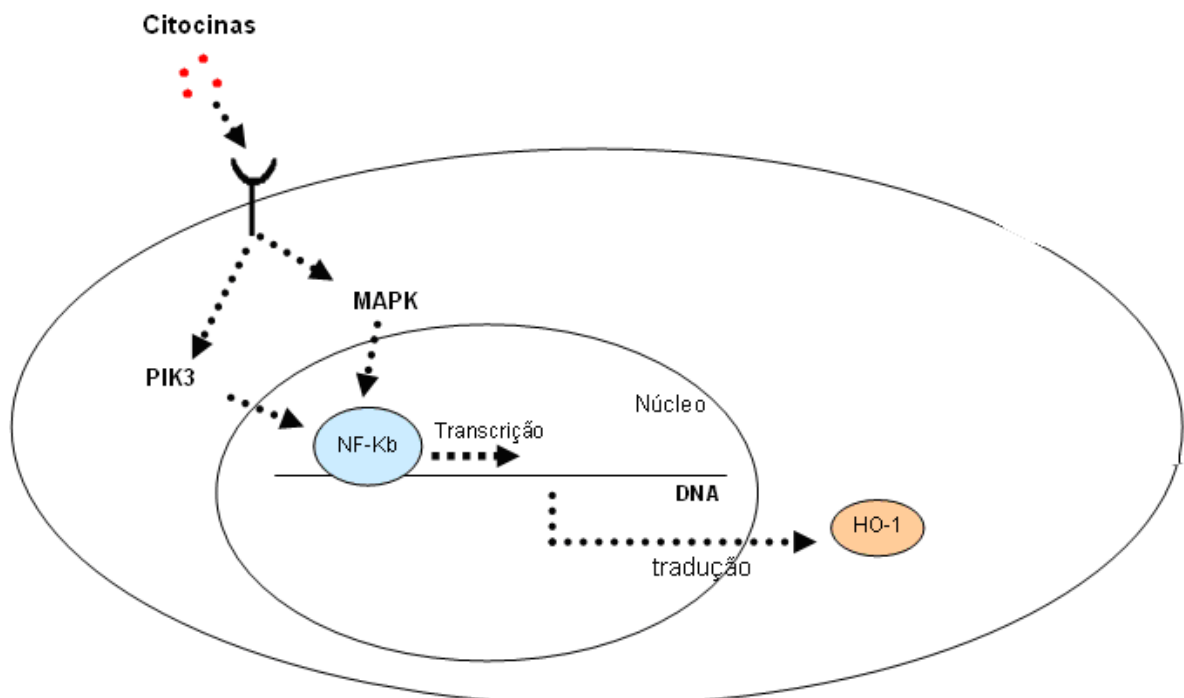


Figura 5: Via de síntese da HO-1 durante processo inflamatório. As citocinas liberadas durante o processo inflamatório ativam o fator NF- κ B via PI3K e MAPK, o

que ocasiona um *feedback* positivo na expressão de HO-1 e posterior síntese da proteína HO-1. Fonte: adaptado a partir de GERALDES *et al.*, 2008.

De fato, HO-1 é induzida em uma variedade de células como endotélio, monócitos/macrófagos, neutrófilos e fibroblastos (ALCARAZ *et al.*, 2003; DATTA; LIANOS, 1999; OSHIRO *et al.*, 1999; VICENTE *et al.*, 2003). Um aumento da atividade da HO-1 nessas células exerce um importante papel no sistema de defesa antioxidante, na redução de radicais livres, na inibição da proliferação celular e de apoptose, assim como reduz a migração de neutrófilos, a exsudação, a liberação de mediadores pró-inflamatórios e a expressão de moléculas de adesão (ALCARAZ *et al.*, 2003; PAE *et al.*, 2004). Por outro lado, a inibição da HO-1 pelo Zinco protoporfirina-IX (ZnPP-IX), um inibidor específico de HO-1, aumenta a expressão das moléculas de adesão e a liberação de mediadores pró-inflamatórios (HUALIN *et al.*, 2012), sugerindo um possível efeito anti-inflamatório da via da HO-1/BVD/CO.

O monóxido de carbono (CO), produto da via HO-1/BVD/CO, tem sido reconhecido como um gás nocivo e perigoso, entretanto, em 1949, Sjostrand mostrou que o CO poderia ser sintetizado endogenamente, e Marks *et al.*, em 1991, mostraram que o CO assumia funções biológicas. A saber, CO exhibe algumas propriedades semelhantes ao NO, incluindo a geração de GPMc (guanilato monofosfato cíclico), atuando na regulação no tônus vascular, sinalização neuronal (neurotransmissor e neuromodulador), inibição de apoptose e da síntese de mediadores inflamatórios, incluindo citocinas, NO e PGs (MCCOUBREY *et al.*, 1997; MORITA *et al.*, 1995; MAINES, 1997; PETRACHE *et al.*, 2000; BARANANO; SNYDER, 2001; OTTERBEIN *et al.*, 2000). Além disso, o CO reduz respostas inflamatórias em diversos modelos de estresse oxidativo (OTTERBEIN *et al.*, 2003).

Há evidências de que o CO module a sinalização intracelular através da via de sinalização JNK, levando à redução da proteína 1 ativadora (OTTERBEIN *et al.*, 2000), e também através de sistemas de transdução de sinais via GMPc (MAINES, 1993; MORITA *et al.*, 1995). Esses efeitos bioquímicos resultam na inibição da síntese de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , TNF α e IL-8 e aumento da síntese de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 (KOBAYASHI *et al.*, 2006; GUILLEN *et al.*, 2008). De fato, a via HO-1/CO/GMPc está envolvida na modulação periférica e espinhal da dor tanto inflamatória quanto não inflamatória (STEINER *et al.*, 2001; NASCIMENTO; BRANCO, 2007, 2008; CARVALHO *et al.*, 2011). Apesar dessas observações, as ações biológicas do CO na manutenção da homeostase,

assim como durante processos patológicos, ainda demandam de maiores investigações.

A biliverdina, também um dos produtos da via HO-1/BVD/CO, exerce ação antioxidante e é capaz de reduzir a migração de neutrófilos, exsudação e a expressão de proteínas de adesão (HAYASHI *et al.*, 1999; VICENTE *et al.*, 2003). Foi demonstrada que a administração de bilirrubina em ratos modula a expressão de moléculas de adesão (selectinas P e E) em resposta ao LPS, sugerindo que a bilirrubina possui propriedades anti-inflamatórias (VACHHARAJANI *et al.*, 2000). A dosagem dos níveis de bilirrubina, portanto, representa uma medida indireta da ativação da via HO-1. Desta forma, processos patológicos que promovam redução nos níveis de bilirrubina podem afetar a viabilidade celular durante períodos de estresse reativo.

Enquanto a biliverdina é convertida em bilirrubina, o ferro, outro produto da HO-1, estimula a síntese de ferritina. Ambos, bilirrubina e ferritina, atuam como agentes antioxidantes (ALCARAZ *et al.*, 2003). Kobayashi *et al.* (2006) afirmaram que o CO, em contrapartida à ferritina e bilirrubina, era o responsável pela regulação da expressão endógena e da indução química de HO-1 sobre a síntese de citocinas. Embora os eventos bioquímicos através dos quais a HO-1 exerça suas ações anti-inflamatória e citoprotetora ainda careça de maiores elucidações, indubitavelmente, CO, BVD e ferro estão envolvidos nessa mediação. Portanto, a via HO-1/BVD/CO tornou-se foco de interesse para estudo na regulação e função sobre patologias humanas.

1.4.3. HO-1/BVD/CO e artrite

Tem-se demonstrada a participação da via HO-1/BVD/CO tanto na artrite em humanos quanto em modelos experimentais de artrite induzida. Em cultura de osteoblastos e condrócitos estimulados por IL-1 β , obtidos de pacientes com osteoartrite em joelhos, observou-se que a indução de HO-1 reduziu a expressão de MMPs, a produção de citocinas pro inflamatórias como TNF α e IL-6, assim como de PGE₂, nitrito, TGF β ₂ (fator transformador de crescimento), TGF β 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; CLERIGUES *et al.*, 2012a, 2012b). Também em cultura de condrócitos com IL-1 β , TNF α e IL-17, obtidos de pacientes

com osteoartrite, observou-se redução da expressão de HO-1, porém, quando incubados com IL-10 ou nitroprussiato de sódio (doador de NO), houve aumento da expressão de HO-1, embora altos níveis de NO gerado a partir da incubação com IL-1 β não aumentaram expressão de HO-1 (FERNANDEZ *et al.*, 2003; VALVASON *et al.*, 2008).

Em sioviócitos de pacientes com artrite reumatóide (AR), cultivados com IL-1 β , a estimulação de HO-1 reduziu a expressão de fosfolipase A₂ (PLA₂) via inibição do fator de transcrição AP-1 (CHI *et al.*, 2012). Também, em cultura de sinoviócitos com LPS de pacientes com artrite reumatóide (AR), a síntese de HO-1 foi estimulada por IL-1 β e TNF α , e inibida por IFN- γ (interferon gama) (KITAMURA *et al.*, 2011), assim como a estimulação de HO-1 inibiu o fator de transcrição NF- κ B inibindo a expressão de IL-1 β , TNF α e IL-6 (PARK *et al.*, 2010).

A expressão de HO-1 é aumentada em pacientes com osteoartrite e artrite reumatóide, sendo mais evidente na artrite reumatóide. Foi observado aumento da expressão de HO-1 em cartilagem articular, embora também tenha sido detectada HO-1 em articulações não inflamadas (FERNANDEZ *et al.*, 2003). Foi identificada HO-1 tanto no tecido sinovial (KOBAYASHI *et al.*, 2006) quanto no lavado sinovial, sendo muito pouco detectada em sinóvia de articulações normais (KITAMURA *et al.*, 2011). Também, em pacientes com artrite idiopática juvenil, foi detectado aumento dos níveis de HO-1 sericamente (TAKAHASHI *et al.*, 2009), e foi sugerido que a indução do gene para HO-1 reduz a progressão de artrite e o dano articular em pacientes com artrite reumatóide (WAGENER *et al.*, 2008).

Semelhante ao encontrado em pacientes, em modelo experimental de artrite aguda em camundongos, foi observado que a indução farmacológica de HO-1 reduziu edema articular, degradação da cartilagem e proliferação de tecidos inflamados articulares, além de reduzir níveis de IL-1 β , IL-6 e TNF α , a secreção de PGE₂ e a atividade de MMP-9 (BENALLAOUA *et al.*, 2007). Cronicamente, em modelos de artrite autoimune induzida por colágeno e adjuvante de Freund em camundongos, entretanto, observou-se um efeito dual de HO-1. A indução de HO-1 resultou em inibição de erosão na cartilagem e redução da fibrose articular, embora a inibição de HO-1 também tenha reduzido a inflamação articular e a destruição da cartilagem (DEVESA *et al.*, 2005a, 2005b). Esse mesmo grupo de pesquisa, entretanto, mostrou, em artrite induzida por colágeno, que tanto inibidores da HO-1 quanto compostos capazes de liberar CO promovem redução do infiltrado celular

inflamatório, da inflamação articular e da destruição articular, assim como redução dos níveis de IL-1 β , IL-2, IL-6, TNF α e PGE₂, mostrando a importância de compostos que liberam CO no tratamento da artrite (FERRÁNDIZ *et al.*, 2008; IBÁÑEZ *et al.*, 2011). Confirmando esses dados, também em artrite induzida por colágeno, foi demonstrado que tanto biliverdina quanto CO reduziram a condição inflamatória e a destruição óssea (BONELLI *et al.*, 2012).

Apesar do grande interesse que HO-1 tem recebido nos últimos anos e a forte evidência dos seus efeitos citoprotetores e anti-inflamatórios, o papel da via HO-1/BVD/CO na artrite da ATM e na dor facial ainda não foi estudado, sendo objetivo do presente trabalho.

1.5. Modelos experimentais para estudo da nocicepção articular e das alterações inflamatórias na articulação temporomandibular

Alguns modelos experimentais, utilizando diferentes espécies animais, têm sido desenvolvidos para o estudo da nocicepção articular e das alterações inflamatórias da ATM. Alguns autores propõem a indução da artrite através de procedimentos cirúrgicos como remoção do disco articular (YAILLEN *et al.*, 1979), perfuração do disco articular (HELMY *et al.*, 1988), remoção de cartilagem articular (ISHIMARU; GOSS, 1992), indução de trauma cirúrgico em tecidos articulares (LEKKAS, 1994), realização de osteotomia subcondilar (MONJE *et al.*, 1993), remoção do côndilo mandibular (SHIMODA *et al.*, 1989) e aplainamento da eminência articular (TOMINAGA *et al.*, 2002). Outros induzem a artrite na ATM através de procedimentos mecânicos como deslocamento do disco articular (ALI; SHARAWY, 1994) e tracionamento do ramo mandibular (IMAI *et al.*, 2001). Outros autores trabalham, ainda, com animais modificados geneticamente (EMBREE *et al.*, 2011). A maioria dos autores, entretanto, induzem alterações inflamatórias através da injeção intra-articular de substâncias na ATM de ratos. Autores como Puzas (2003) acreditam ainda não haver um modelo experimental que sirva para esclarecer a fisiopatologia da dor orofacial e das condições inflamatórias da ATM em todos os estágios, da fase aguda à fase crônica. A saber, os diferentes modelos experimentais apresentam vantagens e desvantagens que os tornam válidos dependendo da abordagem que se pretende fazer, porém há mais similaridades

que diferenças entre estes modelos e a artrite na ATM, o que justifica o seu emprego.

Um dos primeiros modelos de indução de artrite na ATM de ratos através da injeção de substâncias foi desenvolvido por Zamma, em 1983, o qual se utilizou de estímulos mecânicos juntamente à inoculação intradérmica de adjuvante completo de Freund (CFA) na escápula parietal de ratos, sendo a artrite avaliada histologicamente. Ren (1999), fazendo uso dos filamentos de von Frey e pela indução da dor facial por adjuvante completo de Freund (CFA) na ATM de ratos, desenvolveu um método para avaliar o limiar de nocicepção mecânica. Kerins *et al.*, em 2003 e 2005, induziram inflamação/dor aguda na ATM de ratos pela injeção de CFA, avaliando tais achados através de parâmetros comportamentais alimentares.

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

Em 1996, Carleson *et al.* injetaram substância P (i.art.) na ATM de ratos e estudaram o papel da inflamação neurogênica na artrite aguda da ATM. Tominaga *et al.* (1999) injetaram o antígeno ovoalbumina para indução da artrite na ATM de coelho, avaliando inflamação via temperatura na superfície da pele e análise histopatológica, assim como nocicepção articular pela limiar de retirada da cabeça por pressão exercida. Kawai *et al.*, em 2000, utilizaram IL-1 recombinante humana para indução da artrite na articulação temporomandibular de ratos e estudaram a participação de radicais livres na etiopatogenia das alterações degenerativas da ATM cronicamente. Roveroni *et al.* (2001) administraram formalina na ATM de ratos e realizaram estudo comportamental para avaliar dor orofacial aguda.

Lundeberg *et al.* (1996) foi o primeiro a utilizar carragenina para induzir artrite na ATM, avaliando a participação de neuropeptídeos no modelo experimental. Takeuchi *et al.* (2004) induziram inflamação/dor aguda na ATM

através da injeção de carragenina e kaolina e estudaram dor baseados em parâmetros comportamentais e em preparação de nervo isolado. Denadai-Sousa *et al.* (2009) induziu artrite na ATM de ratos com carragenina e avaliaram o limiar de nocicepção articular através de Von-Frey elétrico, assim como avaliaram parâmetros inflamatórios e a participação de citocinas.

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

Para estudo da artrite reumatóide (AR) na ATM, Al-Mobireek *et al.* (2000) induziram a doença pela injeção sistêmica de *Streptococcus pyrogenes* e estudaram AR na ATM através de exames clínicos e tomográficos.

1.6. Artrite induzida por zymozan

Zymozan tem sido usado como um agente pró-inflamatório já há alguns anos (GADO; GIGLER, 1991). É classificado como um polissacarídeo constituinte da parede celular do fungo *Saccharomyces cerevisiae* que causa uma resposta inflamatória quando injetado intradérmica (RIDGER *et al.*, 1997), intraperitoneal (RAO *et al.*, 1994) ou intra-articularmente (GRIFFITHS *et al.*, 1991; GEGOUT *et al.*, 1995; COMERFORD; ETWEBI, 1995; PETTIPHER; SALTER, 1996; ROCHA *et al.*, 1999).

A administração de zymozan ativa a via alternativa do sistema complemento, induz a degranulação de mastócitos a liberar aminas vasoativas como serotonina e histamina, é capaz de gerar produtos do metabolismo do ácido araquidônico, assim como de estimular a liberação de mediadores inflamatórios por macrófagos, neutrófilos e células sinoviais (KONNO; TSURUFUJI, 1983; GRIFFITHS *et al.*, 1991; COATES; MCCOLL, 2001; VALE *et al.*, 2006).

A injeção intra-articular de zymozan em joelho de ratos desencadeia uma artrite caracterizada inicialmente por aumento da permeabilidade vascular e migração celular (ROCHA *et al.*, 1999). Posteriormente, ocorre hipertrofia sinovial, infiltração de células mononucleares, ativação de fibroblastos e formação do *pannus* (KEYSTONE *et al.*, 1977; GEGOUT *et al.*, 1994). Há ainda estudos sugerindo

degradação da cartilagem articular e do osso subcondral na fase crônica da artrite por zymozan (GEGOUT *et al.*, 1995; BEZERRA *et al.*, 2004). Nosso estudo, recentemente publicado, é o primeiro a validar a artrite induzida por zymozan na articulação temporomandibular de ratos (CHAVES *et al.*, 2011) .

2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

A dor é uma experiência complexa e pessoal, refletindo um conjunto de condições psicossociais, fisiológicas, genéticas e culturais, perpassando os processos fisiológicos e fisiopatológicos até o processamento emocional e cognitivo no cérebro humano (JULIUS; BASBAUM, 2001). A dor nas estruturas articulares e musculares em pacientes com DTM, portanto, é uma fonte comum de dor orofacial crônica, o que pode levar à ausência ou insuficiência de trabalho ou interações sociais, resultando em uma redução na qualidade de vida das pessoas acometidas (GREENE *et al.*, 2010). Aliado a isso, estudos epidemiológicos ressaltaram a prevalência da dor orofacial na população, sendo definidos e discutidos critérios de classificação para essas dores, afim de um melhor diagnóstico diferencial e tratamento (DE LEEUW, 2008; GONÇALVES *et al.*, 2010). Sabe-se que essa terapêutica é embasada na fisiopatologia da dor orofacial e que ainda carece de estudos sobre sua fisiopatologia para um melhor controle da dor.

Ademais, devido ao fato de a dor orofacial envolver um grande grupo de condições, e ao fato de as DTMs serem a segunda fonte dessas dores, seguidas das dores odontogênicas, se faz mister o estudo da dor orofacial advinda de alterações nessas estruturas (SHINAL; FILLINGIM, 2007). Por envolver fatores fisiológicos e psicológicos, em animais, portanto, a dor é avaliada de forma indireta. Assim, o componente sensitivo discriminativo da dor é chamado de nocicepção, e os modelos experimentais em animais são modelos de nocicepção (TJØLSEN *et al.*, 1992). Alguns modelos experimentais, utilizando diferentes espécies animais, têm sido desenvolvidos para o estudo da nocicepção articular e das alterações inflamatórias da ATM. Devido ao fato de a artrite induzida por zymozan em joelho de ratos desencadear condições que perpassam da fase aguda à fase crônica da artrite, torna-se válido desenvolver um modelo experimental de hipernocicepção e artrite induzida por zymozan na articulação temporomandibular de ratos.

Somado a isso e diante do grande interesse que a via da HO-1 tem recebido nos últimos anos e a forte evidência de seus efeitos citoprotetores e anti-inflamatórios, é relevante o estudo do papel da via HO-1/BVD/CO na artrite da ATM e na dor facial.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais

Desenvolver um modelo experimental de hipernocicepção articular e inflamação na ATM de ratos induzida por zymosan, investigando o papel da via HO-1/BVD/CO/GMPc/canal de K⁺ sensível a ATP.

3.2. Objetivos específicos

1. Estudar a hipernocicepção articular e parâmetros inflamatórios como: migração celular, aumento de permeabilidade vascular e atividade de mieloperoxidase na induzida por zymosan na articulação temporomandibular de ratos;
2. Investigar o envolvimento da via HO-1/BVD/CO na fisiopatologia da hipernocicepção articular e artrite da articulação temporomandibular de ratos induzidos por zymosan;
3. Analisar a participação de GMPc e canais de K⁺ sensíveis a ATP no mecanismo de ação antinociceptivo da via HO-1/CO na hipernocicepção articular induzida por zymosan em ATM de ratos;
4. Estudar o curso temporal da expressão do RNAm para HO-1, TNF α e IL-1 β em tecidos da ATM e no gânglio trigeminal de ratos submetidos à artrite por zymosan na articulação temporomandibular de ratos;
5. Investigar através de imunohistoquímica as células da ATM e do gânglio trigeminal que produzem HO-1 e os mediadores TNF α e IL-1 β .

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados ratos *Wistar* machos (180-240 g) fornecidos pelo biotério central da Universidade Federal do Ceará (UFC) - *Campus* do PICI, e alocados no biotério setorial da UFC *Campus* Sobral. Os animais receberam água e alimentação *ad libitum*. Todos os esforços foram feitos para minimizar o número e o sofrimento dos animais utilizados.

Todos os experimentos foram realizados de acordo com a legislação nacional vigente e de acordo com as diretrizes da Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) para estudo da dor em animais conscientes (ZIMMERMAN, 1983). O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa com Animais da UFC (protocolo CEUA nº 26/08).

4.2. Drogas, Soluções, Líquidos e Corantes

Todos os reagentes utilizados apresentaram grau de pureza e propriedades analíticas adequadas. As drogas e reagentes utilizados para o desenvolvimento deste trabalho foram:

Álcool absoluto, hematoxilina, eosina, violeta de genciana (Reagen); sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), azul de toluidina, azul de Evans 2,5%, brometo de cetil, trimetil amônio, ácido clorídrico P.A (HCl), hidróxido de sódio (NaOH), ácido sulfúrico (H_2SO_4), álcool etílico P.A, fenol P.A, cloreto de bário (BaCl_2), ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), Ácido fosfórico P.A. (Synth, Brasil), clorofórmio, ácido acético P.A, formaldeído P.A, hidrato de cloral, cloreto de sódio (NaCl), acetato de sódio, peróxido de hidrogênio (H_2O_2), D-galactose (Vetec Química farm. LTDA, SP-Brasil); agarose (Bioagency, São Paulo, SP); albumina sérica bovina (BSA), cloreto de cetilpiridínio (CCP), DEAE-celulose, propano 1,3-diamino, azul de 1,9-dimetilmetileno (ADM), brometo de hexadecil-trimetil-amônio (HTAB), indometacina, tribromoetanol, dextrana sulfato, fosfato de potássio monobásico, fosfato de potássio dibásico, zymosan (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); o-dianosidina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); hemina, DMDC, ZnPP IX, biliverdina, ODQ, glibencalmida (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); tampão carbonato de sódio

(Na₂CO₃); Kits para dosagens séricas: bilirrubina (Labtest[®], Lagoa Santa, MG, Brasil); Anticorpo TNF- α , IL-1 β , HO-1 (Santa Cruz Biotechnology, INC); KIT ABC IgG de cabra (VECTASTAIN); dietil pirocarbonato (DEPC); TRIzol[®], oligo (DT), dNTPs Mix 10mM, *Superscript III reverse transcript* 10000 U (Life/Technologies Invitrogen); *Power SYBR Green Master Mix* (Applied Biosystems). As drogas e reagentes foram solubilizados em salina estéril (0,9%, NaCl), água destilada ou ultra-pura.

4.3. Modelo experimental de hipernocicepção articular e artrite na articulação temporomandibular induzida por zymozan

4.3.1. Injeção intra-articular de zymozan

Os animais foram anestesiados com tribromoetanol a 10 % (1 mL/100 g; i.p.) para proceder à injeção intra-articular (i.art.) de Zy (40 μ L), dissolvido em solução salina estéril, na ATM esquerda dos animais, utilizando-se agulha de insulina com calibre de 29 G em seringa de 0,5 mL (CHAVES *et al.*, 2011). O grupo sham recebeu salina estéril 0,9 % (40 μ L) na ATM esquerda. Primeiramente, realizou-se tricotomia do local, quando então 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 40 μ L de Zy ou salina i.art.

Foi realizada uma curva dose-resposta pela aplicação de Zy nas doses de 0,25; 0,5; 1 ou 2 mg para definir a melhor dose de Zy a ser utilizada para induzir hipernocicepção articular e artrite na ATM. Para tanto, a aferição da hipernocicepção articular foi realizada entre a 2^a h e a 6^a h após administração de Zy ou salina i.art., quando os animais foram sacrificados. Após o sacrifício na 6^a h, foram coletadas as amostras, e os parâmetros avaliados foram contagem total de leucócitos do lavado sinovial e dosagem de mieloperoxidase (MPO) tanto do lavado sinovial quanto dos tecidos articulares da ATM.

Foi realizado também a cinética da hipernocicepção articular e do processo inflamatório na artrite da ATM induzida por zymozan, em que Zy, na dose estabelecida a partir da curva dose-resposta de Zy, ou salina foram administrados i.art., e os animais foram sacrificados nos tempos 2 h, 3 h, 4 h, 6 h, 9 h, 12 h, 24 h,

48 h, 10 d, 20 d e 30 d. Os parâmetros avaliados foram aferição da hipernocicepção articular, contagem total de leucócitos do lavado sinovial, dosagem de mieloperoxidase (MPO) tanto do lavado sinovial quanto dos tecidos articulares da ATM, e avaliação do extravasamento plasmático de azul de Evans.

4.3.2. Teste nociceptivo (avaliação da hipernocicepção articular)

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 à ATM. Classicamente, um dos métodos utilizados para avaliar a presença da hipernocicepção articular é através do emprego de filamentos de von-Frey (REN, 1999). Em nosso estudo, utilizamos 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 da cabeça (DENADAI-SOUZA *et al.*, 2009).

Foi realizado treinamento para que os animais permitissem a aferição da hipernocicepção articular. Primeiramente foi realizada tricotomia na região da ATM esquerda de ratos *Wistar*. Durante o treinamento, os animais eram transferidos para gaiolas individuais onde foram mantidos previamente por trinta minutos e condicionados a receber estímulos mecânicos na ATM esquerda durante os quatro dias que antecederam ao dia de indução da artrite e aferição da nocicepção. No quinto dia, foi obtido o valor basal (média de três medidas) da ATM esquerda (DENADAI *et al.*, 2009). Após a indução da artrite por Zy ou da administração de salina i.art., a hipernocicepção articular foi registrada através da observação do limiar mecânico de retirada da cabeça resultante da média de três medidas consecutivas (CHAVES *et al.*, 2011).

4.3.3. Lavagem da ATM e coleta do lavado sinovial

Os animais foram anestesiados com hidrato de cloral 10 % (0,1 mL/35 g) e sacrificados por exsanguinação. Procedeu-se dissecação dos tecidos superficiais até atingir a ATM esquerda para coleta do lavado sinovial. As ATMs foram então lavadas com volumes de 0,05 mL (2 x) de solução com tampão fosfato de potássio

(PBS) e EDTA utilizando-se seringa de 0,5 mL. Do lavado sinovial, foram obtidas alíquotas para realização de contagem do influxo celular no lavado sinovial, e restante do lavado foi armazenado em tubos de eppendorfs no freezer a -80° C para posterior dosagem de mieloperoxidase e dosagem de citocinas.

4.3.4. Coleta da articulação temporomandibular

Os animais foram anestesiados com hidrato de cloral 10 % (0,1 mL/35 g) e sacrificados por exsanguinação. Procedeu-se dissecação dos tecidos superficiais até atingir a ATM esquerda. Para realização da dosagem de MPO, avaliação do extravasamento de azul de evans, análise histopatológica e imunohistoquímica, foi coletada toda articulação incluindo tecidos duros e tecidos moles da ATM de cada animal.

Para realização da reação em cadeia de polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR), foram coletados os tecidos moles da ATM utilizando material cirúrgico livre de RNAases (aquecido por 200° C/4 h). As amostras foram limpas com PBS estéril tratado com dietilpirocarbonato (DEPC), um inibidor de RNAase, e congeladas imediatamente. Posteriormente, as amostras foram armazenadas em microtubos de 1,5 mL estéreis e mantidas em nitrogênio líquido.

4.3.5. Coleta do gânglio trigeminal

Os animais foram anestesiados com hidrato de cloral 10 % (0,1 mL/35 g) e sacrificados por exsanguinação. 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 para realização de estudo por qRT-PCR e imunohistoquímica.

Para realização de qRT-PCR, foram coletados os gânglios trigeminiais utilizando material cirúrgico livre de RNAases (aquecido por 200° C/4 h). As amostras foram limpas com PBS estéril tratado com dietilpirocarbonato (DEPC), um inibidor de RNAase, e congeladas imediatamente. Posteriormente, as amostras foram armazenadas em microtubos de 1,5 mL estéreis e mantidas em nitrogênio líquido.

4.4. Parâmetros avaliados

4.4.1. Hipernocicepção articular

O limiar mecânico de retirada da cabeça do animal foi procedido conforme descrito anteriormente e avaliado nos tempos 2 h, 3 h, 4 h, 6 h, 9 h, 12 h, 24 h e 48 h após administração de Zy ou salina i.art.

4.4.2. Contagem do influxo celular no lavado sinovial

Nos tempos 2 h, 3 h, 4 h, 6 h, 9 h, 12 h, 24 h e 48 h após administração de Zy ou salina i.art., os animais foram sacrificados, e realizada coleta do lavado sinovial, conforme descrito anteriormente. Dos lavados sinoviais obtidos, retiramos 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.

4.4.3. Medida do extravasamento de azul de Evans / Análise da permeabilidade vascular

Nos tempos 2 h, 4 h, 6 h, 12 h, 24 h e 48 h após administração de Zy ou salina i.art., os animais foram sacrificados, e as ATMs foram coletadas conforme descrito anteriormente. A quantificação de Azul de Evans no tecido articular foi medida por espectrofotometria. O corante foi injetado intravascular (i.v.) na veia da cauda, na dose de 25 mg/kg, dissolvido em salina, 30 minutos antes do sacrifício. Baseado no método de extração de azul de Evans de Kwan *et al.* (1996), imediatamente após a extração do tecido articular, este foi pesado e imergido em solução de 2 mL de formaldeído, assim mantido “*overnight*”. O sobrenadante (100 µl) foi extraído, sua absorbância foi determinada através de espectrofotômetro em 630 nm, e sua concentração determinada pela comparação com uma curva padrão da mesma amostra. A quantidade de azul de Evans foi expressa em µg/g de tecido coletado e calculada por peso da amostra.

4.4.4. Ensaio de mieloperoxidase

Mieloperoxidase (MPO) é uma enzima presente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos e tem sido utilizada como um marcador quantitativo da infiltração de neutrófilo armazenados nos processos inflamatórios em vários tecidos. Para tanto, o lavado sinovial ou tecido articular da ATM foram utilizados a fim de comparar os resultados e determinar por qual material biológico, se lavado sinovial ou tecido da ATM, era mais adequado para avaliar a atividade de MPO no modelo experimental de artrite na ATM induzida por Zy.

Para avaliar a atividade de MPO nos tempos 2 h, 4 h, 6 h, 12 h, 24 h e 48 h, após administração de Zy ou de salina i.art, os animais foram sacrificados, e realizada coleta do lavado sinovial e da ATM, conforme descrito anteriormente. Na ATM, 100 a 200 mg de tecido articular, depois de pesados, foram colocados num tampão de potássio com 0,5% de brometo de hexadecitrimetilamônio (pH 6,0; 50 mg de tecido por mL) e posteriormente homogeneizados em um Politron. A seguir, o homogenato foi centrifugado a 4500 rpm por 12 minutos a 4° C, e o sobrenadante foi colhido. A atividade da MPO por mg de tecido e do lavado sinovial foi realizada através da técnica descrita por Bradley et al. (1982), utilizando 0,0005 % de peróxido de hidrogênio como substrato para a MPO. A unidade da atividade de MPO foi definida como aquela capaz de converter 1 μ mol de peróxido de hidrogênio em água em 1 minuto a 22° C. Durante o ensaio, à medida que o peróxido de hidrogênio era degradado ocorria a produção do ânion superóxido, responsável pela conversão de o-dianosidine em um composto de cor marrom. Foi realizada leitura em leitor de placa com absorvância de 450 nm. Os resultados foram expressos como atividade de U de MPO/g de tecido ou U de MPO por lavado sinovial (BRADLEY et al., 1982).

4.4.5. Análise histopatológica da ATM

Para análise da ATM, nos períodos de 6 h, 10 d, 20 d e 30 d após administração de Zy ou salina i.art., os animais foram sacrificados, e as ATMs foram coletadas conforme descrito anteriormente. As articulações foram fixadas em formol 10 % por 24 h, desmineralizadas com EDTA 10 %, e depois mantidas em água corrente por mais 24 h. Em seguida foram desidratadas, embebidas em parafina e

seccionadas no longo eixo da ATM, em secções de 4 μ m, que incluíram cêndilo, cartilagem articular, tecido periarticular e disco articular para coloração pelo método de eosina-hematoxilina.

As articulações foram analisadas em microscópio óptico Leica acoplado a computador, para as quais foram atribuídos escores de 0 a 4 de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório na membrana sinovial (MS) e nos tecidos periarticular e muscular estriado, e de acordo com o grau de espessamento e fibrose da MS. Os escores atribuídos de acordo com o infiltrado articular foram 0: ausente, 1: discreto, 2: leve, 3: moderado e 4: intenso. Para todas as amostras foi realizado estudo cego para atribuir os parâmetros histopatológicos às amostras. A fim de visualização dos tipos celulares presentes em cada fase da artrite utilizamos aumento de 400 x.

4.5. Modulação farmacológica

4.5.1. Estudo da participação da via HO-1/BVD/CO na hipernocicepção articular e na inflamação da ATM induzidas por Zy

Para determinar se a indução ou inibição de HO-1 é capaz de modular a intensidade da hipernocicepção articular e da inflamação na artrite da ATM induzida por Zy, foram utilizados drogas que atuam na via HO-1/BVD/CO, administrados por via s.c. 1 h antes da indução da artrite por Zy.

- **Hemina:** um substrato análogo utilizado como indutor da HO-1, diluído em tampão hidróxido de sódio (NaOH) 1 mM e solução salina estéril (0,9 %), foi administrado nas doses de 0,1; 0,3 ou 1 mg/kg;
- **DMDC:** doador de CO (produto final da via enzimática de HO-1/BVD/CO), diluído em tween e solução salina estéril (0,9 %), foi administrado nas doses 0,025; 0,25 ou 2,5 μ mol/kg;
- **Biliverdina:** produto final da via enzimática de HO-1/BVD/CO, diluído em tampão hidróxido de sódio (NaOH) 1 mM e solução salina estéril (0,9 %), foi administrado nas doses de 1, 3 ou 10 mg/kg;

- **ZnPP IX:** inibidor seletivo da enzima HO-1, diluído em solução tampão carbonato de sódio (Na_2CO_3) 50 mM e salina estéril (0,9 %), foi administrado nas doses de 1, 3 ou 9 mg/kg;
- **Indometacina:** inibidor de COX, diluído em salina estéril (0,9 %), foi administrado na dose de 5 mg/kg, utilizado como controle positivo.

A análise da hipernocicepção articular foi realizada na 4ª h após indução da artrite, e a contagem do influxo celular no lavado sinovial, dosagem de mieloperoxidase no lavado sinovial e análise histopatológica da ATM foram realizadas na 6ª h após indução da artrite.

4.5.2. Estudo da participação de GMPc e canais de K^+ sensíveis a ATP no mecanismo antinociceptivo e antiinflamatório da via HO-1/CO

Em outra sequência de experimentos, foi estudada a participação de GMPc e canais de K^+ sensíveis a ATP no mecanismo de ação antinociceptivo e antiinflamatório da via HO-1/CO na artrite da ATM induzida por zymosan em ratos. Para tanto, foram utilizadas drogas que modulam essa via, administradas por via s.c. ou i.p., 30 min ou 1 h antes da indução da artrite por Zy.

- **ODQ:** um inibidor seletivo da guanilato ciclase solúvel (GCs), diluído em DMSO e solução salina estéril (0,9 %), foi administrado na dose de 12,5 $\mu\text{mol/kg}$ (s.c.) 1 h antes do DMDC 2,5 $\mu\text{mol/kg}$ (s.c.);
- **Glibenclamida:** um bloqueador de canal de K^+ sensível a ATP, diluído em solução salina estéril (0,9 %), foi administrado na dose 10 mg/kg (i.p.) 30 min antes do DMDC 2,5 $\mu\text{mol/kg}$ (s.c.).

A análise da hipernocicepção articular foi realizada na 4ª h após indução da artrite, e a contagem do influxo celular no lavado sinovial e dosagem de mieloperoxidase no lavado sinovial foram realizadas na 6ª h após indução da artrite.

4.6. Estudo do curso-temporal da expressão do RNAm para HO-1, TNF α e IL-1 β em tecidos da ATM e do gânglio trigeminal de ratos com artrite na ATM induzida por Zy

Para estudar o curso-temporal da expressão gênica de HO-1 e a interligação temporal da via HO-1/BDV/CO com a expressão gênica de dois importantes mediadores inflamatórios, TNF α e IL-1 β , foi realizado o estudo tanto em tecidos da ATM de ratos, quanto no gânglio trigeminal, local onde se situam os corpos celulares dos neurônios aferentes primários. Para tanto, nos períodos de 3 h, 6 h, 9 h, 12 h e 24 h após administração de Zy ou salina i.art., os animais foram sacrificados, e os tecidos da ATM e os gânglios trigeminais foram coletadas conforme descrito anteriormente.

4.6.1. Extração de RNA total

O RNA total foi extraído utilizando TRIzol® (Life Technologies/Invitrogen) (0,1 g de tecido /1,0 mL de TRIzol®) seguindo as orientações do fabricante baseado no método de isolamento de RNA num único passo desenvolvido por Chomczynski *et al.* (1987). Posteriormente o RNA total foi purificado pelo método guanidino-isotiocianato-fenol-clorofórmio e, após posterior precipitação com uso de Iso-Propanol (isopropanol) e etanol 75 %, o RNA total foi mantido (-80° C) em água ultra-pura tratada com DEPC.

4.6.2. Quantificação por espectrofotometria e eletroforese

Para testar a eficácia da extração e pureza do RNA total, foi determinada a concentração de RNA total nas amostras por diluição do RNA (fator de diluição conhecido) e leitura em cubetas de quartzo em espectrofotômetro no comprimento de onda de 260 nm (A_{260}) e 260/280 nm (A_{260}/A_{280}). A qualidade do RNA total foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1 % corado com brometo de etídio (10 mg/ml) em equipamento de luz ultravioleta.

4.6.3. Síntese de cDNA

Para a síntese de cDNA (DNA complementar) foi utilizado por reação 1 µg de RNA total, 0,3 µg do *primer* oligo (dT) (Invitrogen), 1 µL de dNTPs Mix 10 mM e água estéril, que, após misturadas, foram aquecidas a 65° C por 5 min e depois resfriados em gelo. Posteriormente, foi adicionado 1 µL da *Superscript III reverse transcript* 10000 U (Invitrogen) (200 U), 2 µL de DTT 0,1 M, 4 µL de *Fist-Strind Buffer* 5X, e o mix foi incubado no termociclador a 50° C por 50 min, sendo depois aquecido a 70° C por 15 min e posteriormente armazenado a -20° C.

4.6.4. Construção dos *primers* para os genes GAPDH, HO-1, TNF α e IL-1 β

Os primers foram desenhados com base em dados obtidos do *Gene Bank* (NCBI) e submetidos à análise através do programa *PrimerBlast*, com especificidade somente para RNAm de *Rattus norvegicus*. Os *primers* foram produzidos pela Invitrogen (**Tabela 1**). O GAPDH foi utilizado como gene para controle endógeno, denominado também *housekeeping*, por ser um gene que não é afetado pela condição inflamatória analisada, visando normalizar as amostras quanto a possíveis diferenças de quantidade de cDNA adicionadas em cada reação.

NOME	SIGLA	SEQUÊNCIA	TAMANHO DO AMPLICON	NÚMERO DE ACESSO
Fator de necrose tumoral- α	TNF- α	F 5'- CGGGGTGATCGGTCCCAACAA - 3' R 5'- GTGGTTTGCTACGACGTGGGC - 3'	139	NM-012675.3
Interleucina -1 β	IL-1 β	F 5'-ACCTGCTAGTGTGTGATGTTCCCA-3' R 5'- AGGTGGAGAGCTTTCAGCTCACAT-3' F 5'- TCCAGTATCAGAACCGCATTGCCT -3'	109	M98820.1
Heme-oxigenase-1	HO-1	R 5'- AGCAAGTCCGTGTTCAAGGAGGAT -3'	99	NM-012580.2
Gliceraldeído-3-fosfodesidrogenase	GAPDH	F 5'- GGGGGCTCTCTGCTCCTCCC -3' R 5'- CGGCCAAATCCGTTTACACCG -3'	108	NM-017008.3

Tabela 1 - Informação dos genes relatados e das sequências de *primers*.Fonte: NCBI - [National Center for Biotechnology Information](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)

Os primers utilizados para os genes alvo (HO-1, TNF α e IL-1 β) foram desenvolvidos sob a junção éxon-éxon, impossibilitando a amplificação de DNA genômico. A localização éxon-éxon está marcada de branco na figura 6.

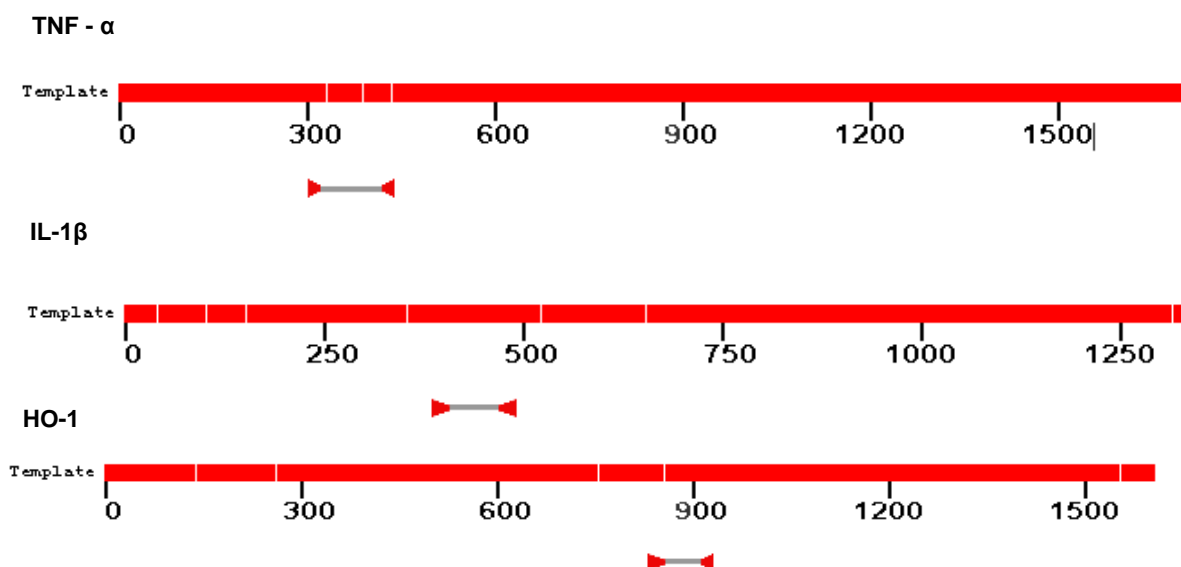


Figura 6. Localização éxon-éxon dos primers desenhados para os genes alvo (TNF α , IL-1 β e HO-1).

4.6.5. PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR)

As análises quantitativas da expressão dos genes foram realizadas através de PCR em Tempo Real (qRT-PCR). Para tanto, 1 μ g do cDNA de cada amostra foi utilizado na reação de qRT-PCR. Além dos ácidos nucleicos, a reação foi composta de iniciadores específicos (300 nm cada) e 10 μ l de 2X *Power SYBR Green Master Mix* (*Applied Biosystems*), com volume final de 20 μ l. A reação de amplificação foi realizada no termociclador *Mastercycler® ep realplex⁴* (Eppendorf) consistindo de desnaturação inicial de 95° C/10 min seguido de 40 ciclos térmicos de 95° C por 15 s, 55° C por 15 s e 60° C por 20 s. Para análise de prováveis contaminantes realizou-se *melting curve* constando de temperatura inicial de 55° C/15 s, gradiente de 20 min e temperatura final de 95° C/15 s (**Figura 7**).

Para as análises da expressão dos genes, foram monitorados os níveis de expressão do GAPDH (controle endógeno), e como controle negativo o *mix* sem o cDNA. Nesse sistema, a amplificação da sequência alvo foi detectada em tempo real

pela emissão de fluoróforos que ocorre quando há formação de dupla fita na região codificada pelo par de *primers*. A quantificação da amplificação foi feita pela fluorescência captada pela unidade óptica do aparelho. Pelas características do sistema qRT-PCR é possível determinar todo o perfil de amplificação, o que representa vantagens metodológicas (SCHMITTGEN *et al.*, 2000).

O monitoramento em tempo real da PCR foi realizado em um termociclador RealPlex 4S (Eppendorf ®) através da detecção dos níveis de fluorescência do SYBR Green. As análises dos dados de fluorescência obtidos foram realizadas pelo *Realplex Software*. Todas as reações, tanto dos genes alvo quanto do controle endógeno, foram realizadas em triplicatas. Os *cycle threshold* – Ct utilizados para as análises foram a média aritmética entre as triplicatas dos genes alvo e controles endógenos. A obtenção da expressão relativa foi realizada pelo método descrito anteriormente (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Os resultados foram normalizados utilizando os *Cycle threshold* – Ct. Para a normalização, foi utilizada a equação $\Delta Ct = Ct (\text{gene alvo}) - Ct (\text{controle endógeno})$. A calibração foi determinada pela fórmula: $\Delta \Delta Ct = \Delta Ct (\text{amostra}) - \Delta Ct (\text{calibrador})$. A quantificação relativa (valores arbitrários) foi obtida pela fórmula $E (\text{eficiência do primer})^{-[\Delta Ct (\text{grupo experimental}) - \Delta Ct (\text{grupo controle})]}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001; PFAFFL, 2001).

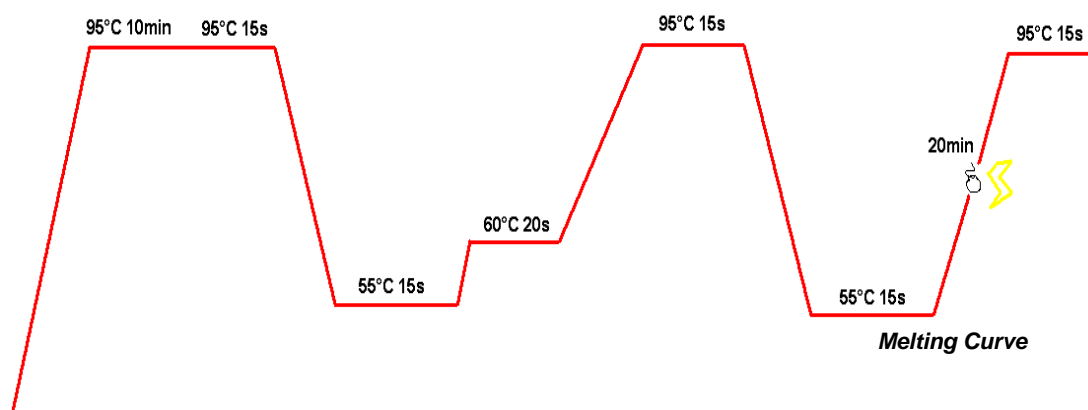


Figura 7. Ilustração do programa utilizado na reação de qRT-PCR. A reação de qRT-PCR foi realizada através de desnaturação inicial de 95° C/10 min, seguido de 40 ciclos térmicos de 95° C por 15 s, 55° C por 15 s e 60° C por 20 s. Para análise de prováveis contaminantes realizou-se *melting curve* constando de temperatura inicial de 55° C/15 s, gradiente de 20 min e temperatura final de 95° C/15 s.

4.7. Imunohistoquímica da ATM e do gânglio trigeminal para HO-1, TNF α e IL-1 β

Para comprovação de que a expressão gênica de HO-1, TNF α e IL-1 β resultou na síntese proteica desses mediadores inflamatórios e para identificar quais tipos celulares produzem HO-1, TNF α e IL-1 β , foi realizado estudo por imunohistoquímica na ATM e no gânglio trigeminal de ratos, utilizando método de estreptavidina-biotina-peroxidase (HSU; RAINE, 1981).

Para tanto, na 6^a h após administração de Zy ou salina i.art. os animais foram sacrificados, e os tecidos da ATM foram coletados conforme descrito anteriormente. Na 12^a h após administração de Zy ou salina i.art., os animais foram sacrificados, e os gânglios trigeminais foram coletados conforme descrito anteriormente. As ATMs e os gânglios trigeminais foram fixados em formol 10 % por 24 h. As ATMs foram desmineralizadas por EDTA a 10 % e depois mantidas em água corrente por mais 24 h. Em seguida as peças tanto da ATM quanto do gânglio trigeminal foram desidratadas e embebidas em parafina. As ATMs foram seccionadas em seu longo eixo, em secções de 4 μ m, que incluíam cômulo, cartilagem articular, tecido periarticular e disco articular, e os gânglios trigeminais foram seccionados em seu longo eixo, também em secções de 4 μ m.

Resumidamente, os cortes histológicos da ATM e do gânglio trigeminal foram desparafinizados e reidratados em xileno e álcool. Após recuperação com antígeno, peroxidase endógena foi realizada (15 min) com 3 % (v/v) de peróxido de hidrogênio e lavada em tampão fosfato (PBS). Os cortes foram incubados “overnight” (4^o C) com anticorpo primário anti-HO-1, anti-TNF α ou anti-IL-1 β (Santa Cruz®) de coelho diluído 1:200 em PBS com albumina sérica bovina (PBS-BSA). Os cortes foram então incubados com “biotinylated goat anti-rabbit”; diluído 1:400 em PBS-BSA. Depois de lavado, os cortes foram incubados com “avidin-biotin-horseradish peroxidase” conjugada (Strep ABC complexo pela Vectastain® ABC Reagent e solução de substrato de peroxidase) por 30 min, de acordo com o protocolo de Vectastain. HO-1, TNF α e IL-1 β foram visualizados com o cromógeno 3,3`diaminobenzidine (DAB). Controles negativos foram processados simultaneamente como descrito acima, sendo que o primeiro anticorpo foi substituído por PBS-BSA 5 %. Os cortes foram corados com hematoxilina,

desidratados em uma série de concentrações de álcool, clareados em xilol e, em seguida, a lâminula foi colocada.

4.8. Estudo dos níveis séricos de bilirrubina em ratos com artrite na ATM induzida por Zy

Para comprovação do aumento da atividade de HO-1, foi realizada a determinação da concentração sérica de bilirrubina. Para tanto, na 9^a h após administração de Zy ou salina i.art., os animais foram anestesiados com hidrato de cloral 10 % (0,1 mL/35 g), e o sangue do coração foi coletado em eppendorf contendo 20 µL de heparina. A seguir as amostras foram centrifugadas a 4^o C, 3200 g durante 10 min, e o sobrenadante coletado e armazenado a -80^o C para posterior dosagem de bilirrubina.

A bilirrubina foi medida através de um kit comercial (Labtest, Brasil). O procedimento para a dosagem de bilirrubina direta consistiu em adicionar 1 mL de água destilada a 0,1 mL da solução de diazo reagente (10 µL de Nitrato de Sódio 72,5 mmol/L com 0,3 mL de ácido sulfanílico 5,75 mmol/L), seguido de 50 µL da amostra de cada animal, quando então foi misturado e aguardou-se o tempo de 5 min. Determinou-se a absorbância em 525 nm em espectrofotômetro ou filtro verde (500 a 540), acertando o zero com branco. A cor permanece estável por 30 min. O mesmo procedimento foi realizado para dosar bilirrubina total, modificando apenas a solução que consistiu em adicionar 1 mL de acelerador (cafeína 130 mmol/L, benzoato de sódio 260 mmol/L, acetato de sódio 460 mmol/L e surfactante) a 0,1 mL da solução de diazo reagente (10 µL de nitrato de Sódio 72,5 mmol/L com 0,3 mL de ácido sulfanílico 5,75 mmol/L), seguido de 50 µL da amostra de cada animal. Para chegar ao resultado final, dosa-se a absorbância padrão da amostra que consiste em adicionar 1 mL de água destilada a 0,1 mL de ácido sulfanílico 5,75 mmol/L, seguido de 50 µL da amostra de cada animal. Alcançados esses resultados, aplica-se a fórmula: Absorbância Teste (direta ou total)/ Absorbância Padrão x 10. Os resultados expressos em bilirrubina/µL da amostra.

4.9. Dosagem de IL-1 β no lavado sinovial de ratos com artrite na ATM induzida por Zy

Para comprovação de que a citocina IL-1 β foi produzida, realizou-se dosagem da citocina no lavado sinovial. Para tanto, na 6^a h após administração de Zy ou salina i.art., os animais foram sacrificados, e realizada coleta do lavado sinovial, conforme descrito anteriormente. A detecção da citocina IL-1 β foi realizada por ELISA, usando o Kit DuoSet (R&D Systems). Resumidamente, a placa para ELISA de 96 poços foi incubada por 18 h a 4° C com 100 μ L por poço de anticorpo de captura para IL-1 β . Posteriormente, a placa foi lavada três vezes com 300 μ L de tampão de lavagem e bloqueadas com 100 μ L por poço BSA 1 %. Após bloqueio da placa com BSA 1 % por 1 hora, a placa foi novamente lavada três vezes com 300 μ L de tampão de lavagem. 50 μ L da curva padrão foram adicionados em duplicata a cada poço em várias diluições e 50 μ L das amostras. Em seguida a placa foi incubada por 2 horas a 4° C. A placa foi então lavada três vezes com 300 μ L de tampão de lavagem e depois incubada com anticorpo de detecção para IL-1 β . Após o período de incubação a 4° C por 2 horas, a placa foi lavada novamente por três vezes com 300 μ L de tampão de lavagem e incubada à temperatura ambiente por 20 minutos com 100 μ L de estreptavidina diluída 1:200. A placa foi lavada novamente por três vezes com 300 μ L de tampão de lavagem, e 100 μ L da solução de substrato para revelação (Kit DuoSet, R&D Systems Catalog – Dy999) foram adicionados. A placa foi incubada durante 20 minutos, no escuro e à temperatura ambiente. A reação enzimática foi parada com a solução de parada (H₂SO₄), e a absorbância foi medida a 450 nm. O resultado foi expresso em pg/mL.

4.10. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). As médias dos vários procedimentos experimentais foram comparadas utilizando a análise de variância (ANOVA), e a significância entre os grupos estabelecida pelo teste Bonferroni. Para análise dos resultados da dosagem de citocina, utilizou-se teste t. À análise histopatológica, os dados foram expressos em medianas e foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis e Dunn's para diferenciação estatística. As análises da expressão dos genes foram realizadas através do método

de Livak e Scmittgen (2001). Para a realização das análises quantitativas, os valores de *Cycle threshold* (Ct) obtidos para cada gene de cada animal foram normalizados com o nível de expressão de GAPDH para o estudo da expressão das moléculas de RNAm da HO-1, TNF α e IL-1 β durante a evolução da artrite na ATM. O nível de expressão relativa foi obtido pelo cálculo do $\Delta\Delta Ct = m\Delta Ct_a$ (Média variação de Ct do grupo experimental alvo) – $m\Delta Ct_b$ (Média da variação de Ct do grupo experimental controle). A quantificação relativa foi obtida pelo método $E^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK; SCMITTGEN, 2001; PFAFFL, 2001). A especificidade das reações foi confirmada pela *melting curve*. O número (n) de animais por grupo experimental foi no mínimo 5. O nível de significância aceito foi $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Modelo experimental de hipernocicepção articular na artrite da ATM induzida por zymosan em ratos

5.1.1. Dose-resposta da hipernocicepção articular e da inflamação na ATM induzidas por Zy

Realizou-se, primeiramente, padronização e validação da dose-resposta de Zy na indução da artrite na ATM em ratos, seguida da avaliação do curso temporal da doença.

A hipernocicepção articular induzida por Zy na ATM esquerda de ratos em todas as doses (0,25; 0,5; 1 e 2 mg), mensurada claramente pela redução do limiar mecânico de retirada da cabeça, foi observada a partir da 2ª h após a indução da artrite quando comparado ao grupo sham ($p < 0,05$) (**Figura 8**). Zy na dose de 2 mg apresentou redução significativa do limiar mecânico de retirada da cabeça na 4ª h e na 6ª h quando comparado a todas as outras doses de Zy ($p < 0,05$). Ademais, Zy 2mg aumentou significativamente a migração leucocitária, observada através da contagem total do número de leucócitos no lavado sinovial, quando comparado ao grupo sham e a todas as outras doses de Zy ($p < 0,05$) (**Figura 9**).

Essa redução no limiar mecânico de retirada da cabeça e o aumento da contagem de leucócitos totais no lavado sinovial foram acompanhados pelo aumento da atividade de mieloperoxidase nos tecidos articulares e no lavado sinovial na 6ª h após indução da artrite. Nos tecidos articulares, Zy 2 mg resultou aumento significativo da atividade de MPO na 6ª h após a indução da artrite quando comparado ao grupo sham ($p < 0,05$) (**figura 10**). Resultado semelhante foi observado na 6ª h após a indução da artrite em que também Zy 2 mg aumentou significativamente a atividade de MPO no lavado sinovial em relação ao grupo sham ($p < 0,05$) (**figura 11**).

A dose de Zy 2 mg, portanto, foi a escolhida para induzir artrite na ATM de ratos, em detrimento das demais, por ter sido a melhor dose para causar alteração em ambos, comportamento nociceptivo e parâmetros inflamatórios.

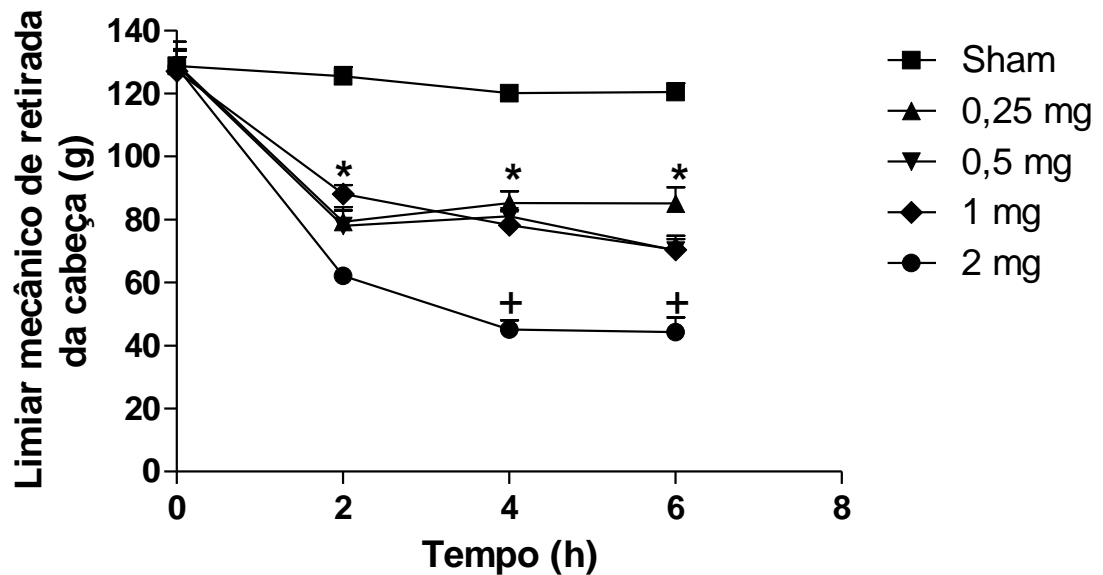


Figura 8. Curva dose-resposta da hipernociceção articular em ratos submetidos à artrite na ATM induzida por zymosan. Zy (0,25; 0,5; 1 ou 2 mg; 40 μ L) foi injetado na ATM esquerda de ratos. O grupo sham recebeu 40 μ L solução salina i.art. O limiar mecânico de retirada da cabeça foi mensurado antes e após a injeção intra-articular de Zy ou salina durante 6 h. A administração de Zy em todas as doses reduziu o limiar de hipernociceção articular a partir da 2^a h. A dose de Zy 2 mg reduziu o limiar mecânico de retirada da cabeça na 4^a h e 6^a h comparado às demais doses. Os dados representam a média \pm epm (n=6). * $p < 0,05$ em relação ao grupo sham, + $p < 0,05$ em relação aos grupos 0,25, 0,5 e 1 mg (ANOVA, Bonferroni).

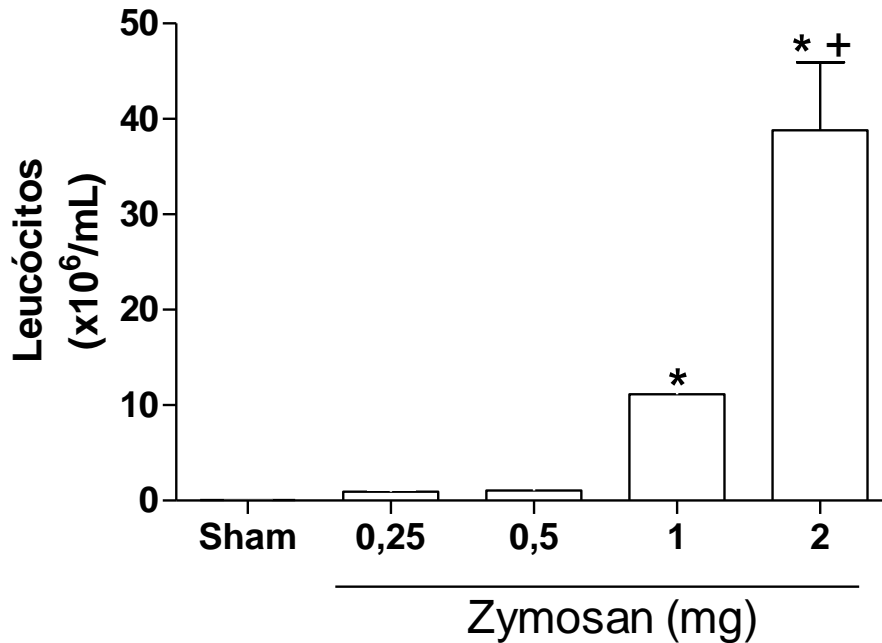


Figura 9. Curva dose-resposta da contagem total de leucócitos do lavado sinovial da ATM de ratos submetidos à artrite induzida por zymosan. Zy (0,25; 0,5; 1 ou 2 mg; 40 μ L) foi injetado na ATM esquerda de ratos. O grupo sham recebeu 40 μ L solução salina i.art. A migração leucocitária foi avaliada na 6^a h após a injeção intra-articular de Zy ou salina. A administração de Zy nas doses de 1 mg e 2 mg foi capaz induzir migração leucocitária na 6^a h. A dose de Zy 2 mg aumentou a migração leucocitária comparada às demais doses de Zy. Os dados representam uma média \pm epm (n=6). * $p < 0,05$ em relação ao grupo sham, + $p < 0,05$ em relação aos grupos 0,25, 0,5 e 1 mg (ANOVA, Bonferroni).

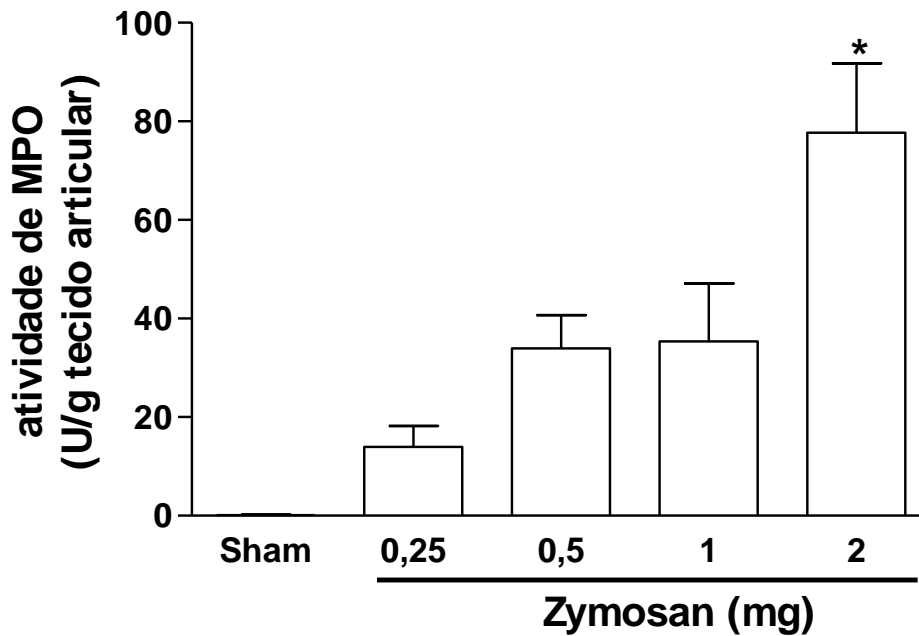


Figura 10. Estudo da atividade de mieloperoxidase do tecido articular de ratos submetidos à artrite da ATM induzida por zymosan. Zy (0,25; 0,5; 1 ou 2 mg; 40 μ L) foi injetado na ATM esquerda de ratos. O grupo sham recebeu 40 μ L solução salina i.art. A atividade de MPO no tecido articular foi avaliada na 6^a h após a injeção intra-articular de Zy ou salina. Zy 2 mg aumentou atividade de MPO na 6^a h após indução da artrite. Os dados representam a média \pm epm (n=6). * $p < 0,05$ em relação ao grupo sham (ANOVA, Bonferroni).

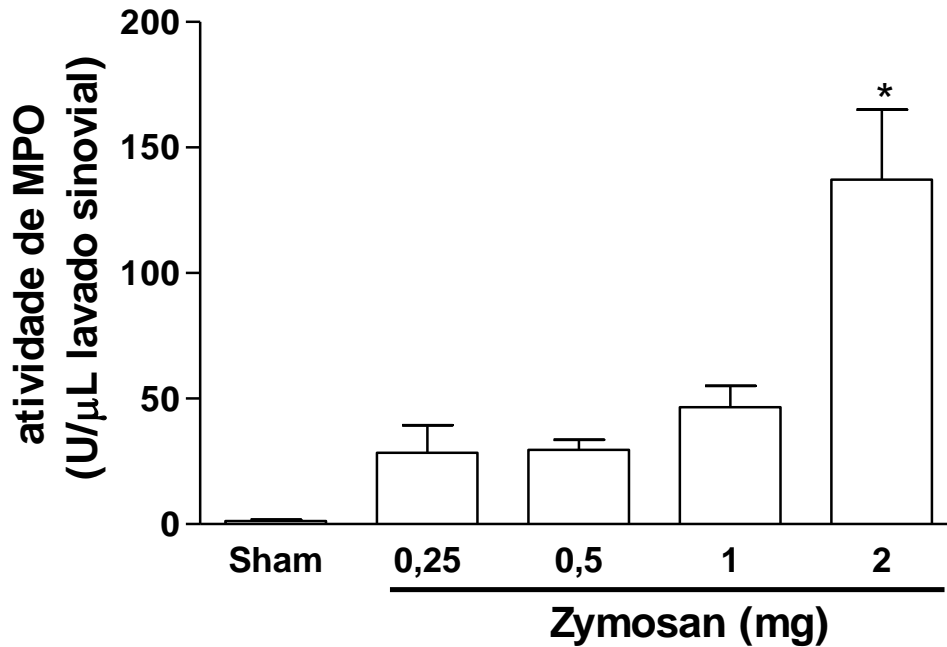


Figura 11. Estudo da atividade de mieloperoxidase do lavado sinovial na artrite da ATM de ratos induzida por zymosan. Zy (0,25; 0,5; 1 ou 2 mg; 40 μL) foi injetado na ATM esquerda de ratos. O grupo sham recebeu 40 μL solução salina i.art. A atividade de MPO no lavado sinovial foi avaliada na 6^a h após a injeção intra-articular de Zy ou salina. Zy 2 mg aumentou atividade de MPO na 6^a h após indução da artrite. Os dados representam a média ± epm (n=6). * $p < 0,05$ em relação ao grupo sham (ANOVA, Bonferroni).

5.1.2. Cinética da hipernocicepção articular e da inflamação na ATM induzidos por Zy

Observou-se que a administração i.art. de Zy 2 mg resultou em significativa hipernocicepção articular tempo-dependente iniciada na 2^a h, com pico entre a 3^a h e 4^a h, mantendo-se até a 6^a h quando comparado ao grupo sham ($p < 0,05$) (**figura 12**). A partir da 9^a h ainda se observa significativa redução do limiar mecânico de retirada da cabeça, quando comparado ao grupo sham ($p < 0,05$), porém com significativo início de redução de hipernocicepção articular quando comparado aos grupos Zy na 3^a h e 4^a h, retornando ao nível do grupo sham após 48 h ($p < 0,05$). A injeção i.art. de salina (grupo sham) não foi capaz de alterar o limiar de resposta nociceptiva em nenhum dos tempos avaliados.

Também a administração i.art. de Zy 2 mg resultou em um aumento significativo do número de células polimorfonucleares. A contagem total de leucócitos mostrou um aumento significativo iniciado na 3^a h após a indução da artrite, com pico de influxo leucocitário na 6^a h, sendo mantido até a 12^a h após indução da artrite quando comparado ao grupo sham ($p < 0,05$) (**figura 13**). O aumento da infiltração de neutrófilos foi certificado pelo aumento da atividade de MPO realizado em ambos tecido articular e lavado sinovial. Observa-se que Zy 2 mg promoveu aumento da atividade de MPO nos tecidos articulares nos momentos 6^a h e 12^a h após indução da artrite quando comparado ao grupo sham ($p < 0,05$) (**figura 14**). Visto que MPO se encontra em grânulos azurófilos de neutrófilos, admite-se que o infiltrado inflamatório era composta principalmente por neutrófilos. No lavado sinovial, observou-se também aumento da atividade de MPO na 6^a h e 12^a h após indução da artrite por Zy 2 mg na ATM esquerda dos animais quando comparado aos grupos sham ($p < 0,05$) (**figura 15**).

Essas alterações foram acompanhadas pelo aumento da permeabilidade vascular na ATM observada pelo extravasamento plasmático de azul de evans para os tecidos articulares. Observou-se que ocorreu extravasamento plasmático na 4^a h e 6^a h após indução da artrite por Zy de forma significativa em relação ao grupo sham ($p < 0,05$). Uma segunda fase de extravasamento de azul de evans foi observada na 24^a h comparado ao grupo sham ($p < 0,05$) (**figura 16**), porém não foi acompanhada do aumento da atividade de MPO. Durante o curso temporal da artrite na ATM induzida por Zy, portanto, houve pico de hipernocicepção articular entre a

3^a h e a 4^a h e pico de influxo celular na 6^a h, observando-se a presença de neutrófilos em tecidos articulares e lavado sinovial até a 12^a h após indução da artrite. Baseado nesses resultados, propomos a utilização da 3^a h ou 4^a h para avaliar os mecanismos envolvidos na hipernocicepção articular, e a 6^a h para avaliar os mecanismos envolvidos na inflamação da artrite na ATM induzida por Zy em ratos.

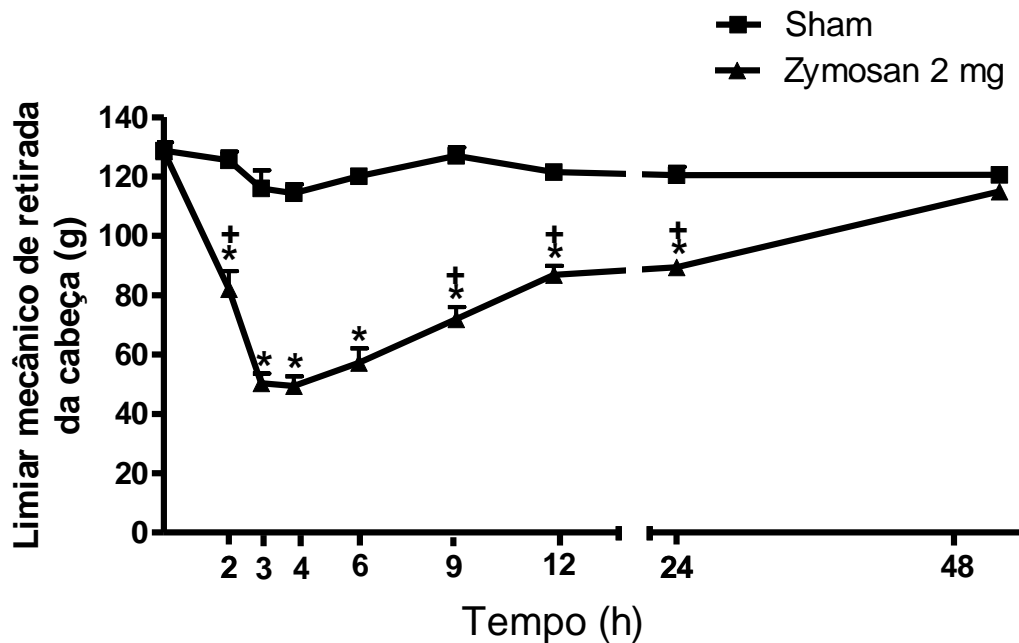


Figura 12. Cinética da hipernocicepção articular em ratos submetidos à artrite na ATM induzida por zymosan. Zy (2 mg; 40 μ L) foi injetado na ATM esquerda de ratos. O grupo sham recebeu 40 μ L solução salina i.art. O limiar mecânico de retirada da cabeça foi mensurado antes e após a injeção intra-articular de Zy ou salina durante 48 h. A administração de Zy 2 mg reduziu o limiar mecânico de retirada da cabeça a partir da 2^a h até a 24^a h, com pico entre a 3^a h e a 4^a h. Os dados representam a média \pm epm (n=6). * $p < 0,05$ em relação ao grupo sham, [†] $p < 0,05$ em relação aos grupos Zymosan 2 mg na 3^a h e 4^a h (ANOVA, Bonferroni).

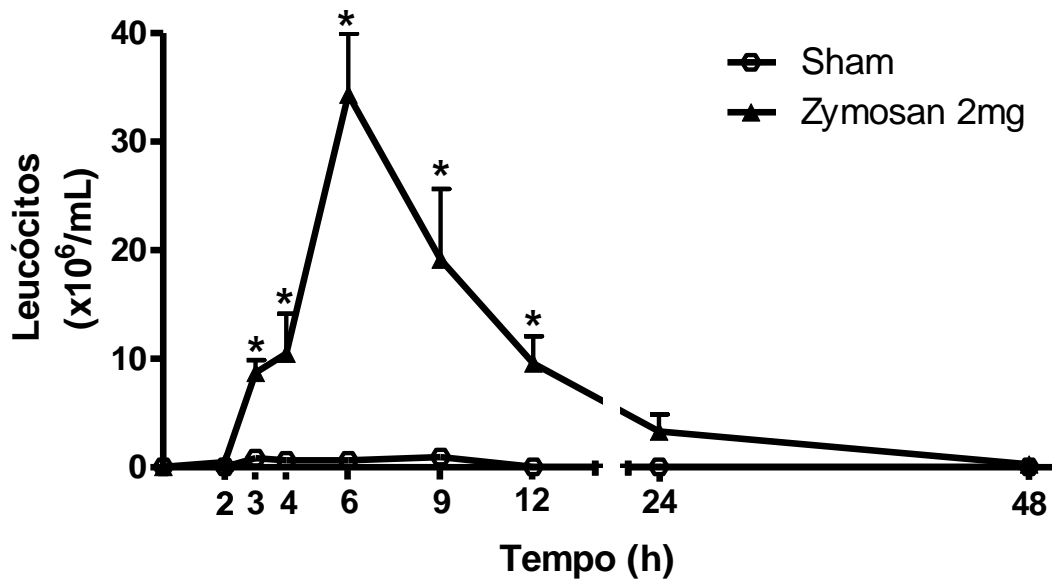


Figura 13. Cinética da migração leucocitária no lavado sinovial da artrite na ATM de ratos induzida por zymosan. Zy (2 mg; 40 μ L) foi injetado na ATM esquerda de ratos. O grupo sham recebeu 40 μ L solução salina i.art. A migração leucocitária foi avaliada durante 48 h após a injeção intra-articular de Zy ou salina. A administração de Zy 2 mg resultou aumento do influxo leucocitário a partir da 3^a h até a 12^a h, com pico 6^a h. Os dados representam a média \pm epm (n=6). * $p < 0,05$ em relação ao grupo sham (ANOVA, Bonferroni).

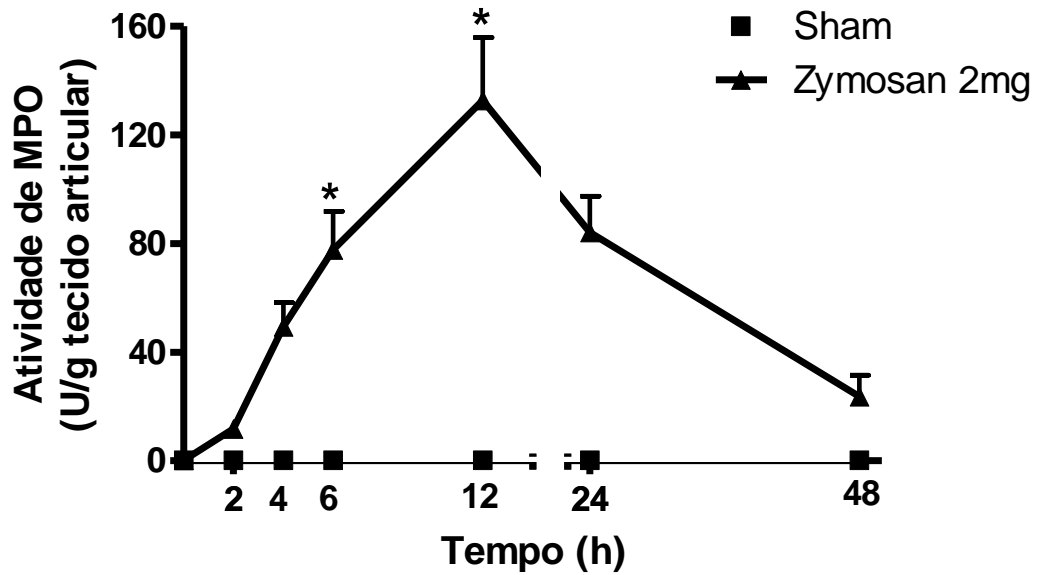


Figura 14. Cinética da atividade de mieloperoxidase do tecido articular de ratos submetidos à artrite da ATM induzida por zymosan. Zy (2 mg; 40 μ L) foi injetado na ATM esquerda de ratos. O grupo sham recebeu 40 μ L solução salina i.art. A atividade de MPO no tecido articular foi avaliada durante 48 h após a injeção intra-articular de Zy ou salina. Zy 2 mg aumentou atividade de MPO nas 6^a h e 12^a h após indução da artrite. Os dados representam a média \pm epm (n=6). * $p < 0,05$ em relação ao grupo sham (ANOVA, Bonferroni).

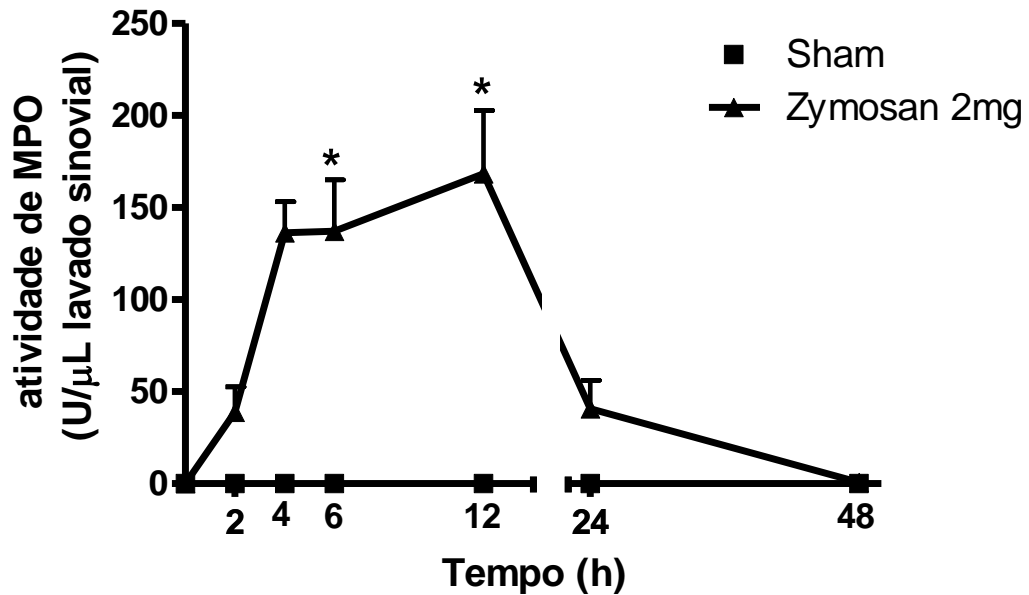


Figura 15. Cinética da atividade de mieloperoxidase do lavado sinovial da ATM de ratos submetidos à artrite da ATM induzida por zymosan. Zy (2 mg; 40 μ L) foi injetado na ATM esquerda de ratos. O grupo sham recebeu 40 μ L solução salina i.art. A atividade de MPO no lavado sinovial foi avaliada durante 48 h após a injeção intra-articular de Zy ou salina. Zy 2 mg aumentou atividade de MPO nas 6^a h e 12^a h após indução da artrite. Os dados representam a média \pm epm (n=6). * $p < 0,05$ em relação ao grupo sham (ANOVA, Bonferroni).

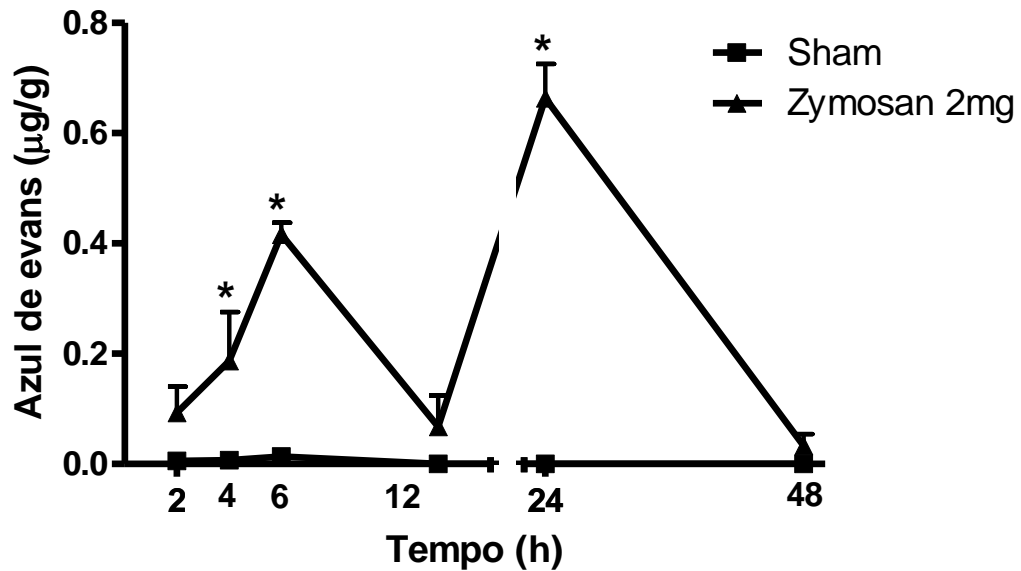


Figura 16. Estudo do extravasamento de azul de Evans como medida da análise do aumento permeabilidade vascular na artrite da ATM em ratos induzida por zymosan. Zy (2 mg; 40 µL) foi injetado na ATM esquerda de ratos. O grupo sham recebeu 40 µL solução salina i.art. Azul de Evans 25 mg/kg foi injetado i.v. 30 minutos antes do sacrifício. Zy 2 mg aumentou a permeabilidade vascular detectada através do extravasamento do Azul de Evans na 4^a h, 6^a h e 24^a h após indução da artrite. Os dados representam a média ± epm (n=6). * $p < 0,05$ em relação ao grupo sham (ANOVA, Bonferroni).

5.1.3. Estudo histopatológico da ATM de ratos com artrite induzida por Zymosan

Na análise histológica da ATM, realizada através da coloração HE, podemos observar na **figura 17 A** 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) à cabeça da mandíbula, e a membrana sinovial em sua extremidade anterior (MS), com toda a estrutura circundada por tecido muscular estriado (TME). Na **figura 17 B** visualizamos o tecido sinovial em aumento de 400 x, em que se observam parâmetros de normalidade sem infiltrado celular inflamatório ou edema.

A análise histopatológica mostrou diferença morfológicas na 6^a hora, 10^o, 20^o e 30^o dias após indução da artrite entre os grupos sham e Zy 2 mg. Na 6^a hora após indução da artrite, observou-se infiltrado celular inflamatório na membrana sinovial (MS), no tecido conjuntivo periarticular, no tecido muscular esquelético e espessamento da MS comparado ao grupo sham, não apresentando ainda fibrose da MS (**figura 17 C**). O infiltrado celular presente na 6^a hora após indução da artrite é constituído predominantemente de polimorfonucleares (neutrófilos) caracterizando a inflamação aguda. Neste momento também podemos observar a presença de edema na MS (**figura 17 D**).

A tabela 2 apresenta os escores atribuídos à análise histopatológica das ATM comparando valores entre grupos sham e grupos com artrite na ATM induzida por *zymosan* nos tempo 6^a h, 10^o, 20^o e 30^o dias após indução da artrite através das colorações hematoxilina-eosina (HE). Escores de 0 a 4 foram atribuídos conforme aumento do infiltrado celular inflamatório, a saber 0: ausente, 1: discreto, 2: leve, 3: moderado e 4: intenso. Observou-se significativo aumento dos parâmetros inflamatórios nos grupos Zy comparado ao grupo sham ($p < 0,05$).

No 10^o d após indução da artrite, já se observa fibrose da MS, continuando a apresentar infiltrado celular inflamatório na MS, no tecido conjuntivo periarticular, no tecido muscular esquelético e hiperplasia da MS (**figura 18 A**). Na avaliação da membrana sinovial (**figura 18 B**), observa-se que as células predominantes são mononucleares. No 20^o d após indução da artrite, observou-se infiltrado celular inflamatório na membrana sinovial, hiperplasia e fibrose na MS,

estando reduzida a infiltração celular no tecido conjuntivo periarticular e no tecido muscular esquelético (**figura 18 C**), o mesmo observado no 30º dia após indução da artrite (**figura 18 E**).

Já distinguindo a fase crônica da artrite, no 10º d, as células inflamatórias presentes são predominantemente mononucleares (linfócitos e macrófagos) apresentando proliferação de fibroblastos (**figura 18 B**). No 20º d (**figura 18 D**) e no 30º d (**figura 18 F**) após indução da artrite, encontram-se também células mononucleares (linfócitos e macrófagos) assim como fibroblastos, associados à intensa deposição de fibras colágenas, e observa-se a presença de neovascularização na membrana sinovial articular.

Tabela 2. Análise histopatológica da ATM de ratos com artrite induzida por zymosan através da coloração pelo método hematoxilina-eosina (HE).

	Infiltrado celular MS	Espessamento MS	Infiltrado celular tec periarticular	Infiltrado celular tec muscular	Fibrose MS
Sham	0(0-0)	0(0-0)	0(0-0)	0(0-0)	0(0-0)
Zy 6 h	2,5 (1-3)*	3 (0-3)*	4 (4-4)*	3 (2-4)*	0(0-0)
Zy 10 d	3,5 (2-4)*	3 (2-3)*	4 (4-4)*	1,5 (1-3)*	2,5 (1-4)*
Zy 20 d	3 (2-4)*	4 (2-4)*	3 (3-4)*	1 (1-2)	3 (2-4)*
Zy 30 d	3 (2-4)*	4 (4-4)*	3 (2-4)*	1 (1-2)	4 (3-4)*

* $p < 0,05$ em relação ao grupo sham (Kruskal-Wallis, Dunn's). MS: membrana sinovial

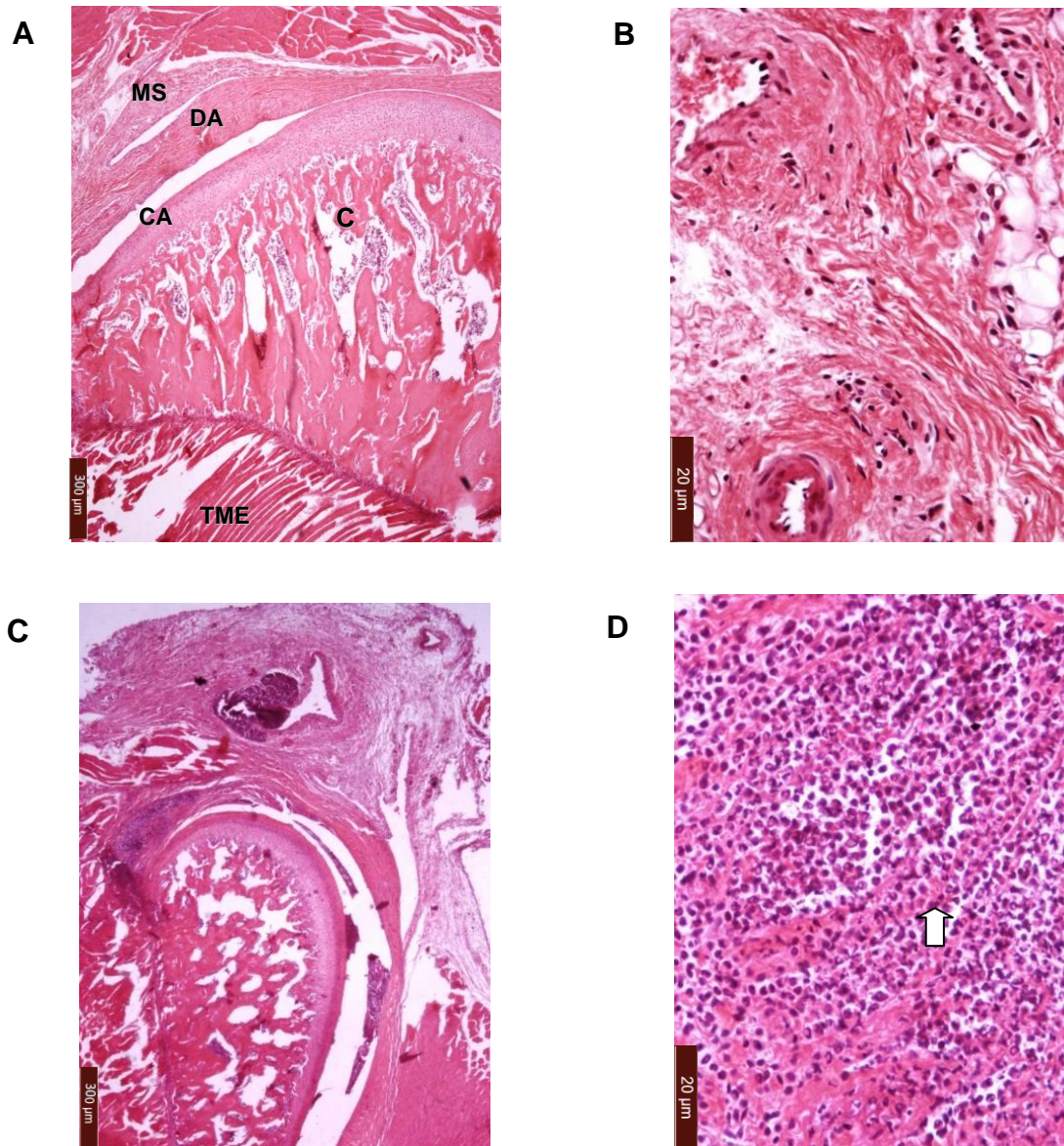


Figura 17. Fotomicrografias da análise histopatológica da ATM e de tecidos periarticulares na artrite aguda. Os animais receberam 40µL de Zy 2 mg ou salina i.art na ATM, foram sacrificados na 6ª h. (A): ATM de animais sham (40 x). (B): Membrana sinovial da ATM de animais sham, mostrando parâmetros de normalidade sem infiltrado celular inflamatório ou edema (400 x). (C) ATM de animais com artrite mostrando infiltrado celular inflamatório na MS, no tecido conjuntivo periarticular, no tecido muscular estriado e espessamento da MS (40 x). (D) Membrana sinovial da ATM mostrando edema e infiltrado celular inflamatório com predominância de polimorfonucleares (400 x). C: cabeça da mandíbula, CA: cartilagem articular, DA: disco articular, MS: membrana sinovial, TME: tecido muscular estriado. Seta branca: células polimorfonucleares.

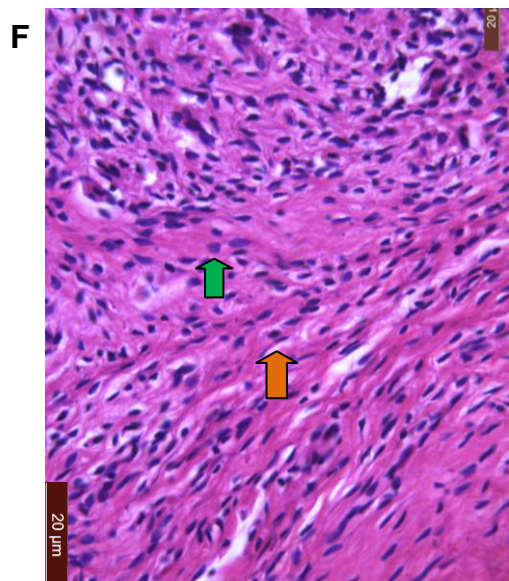
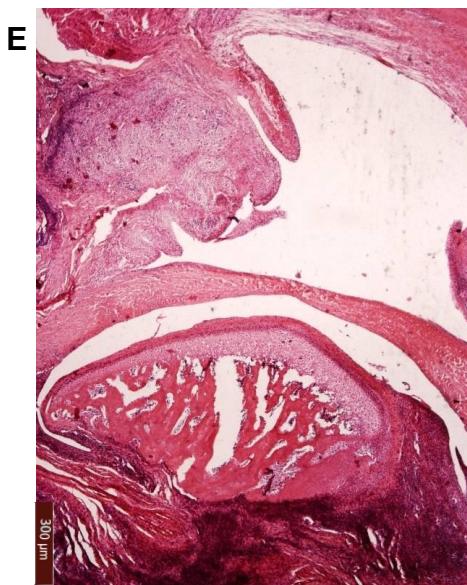
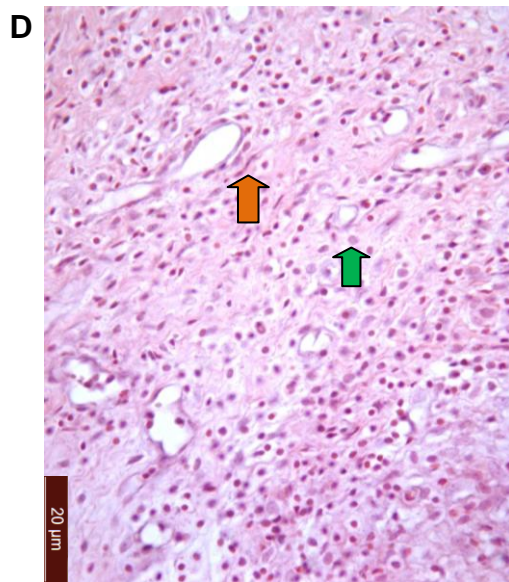
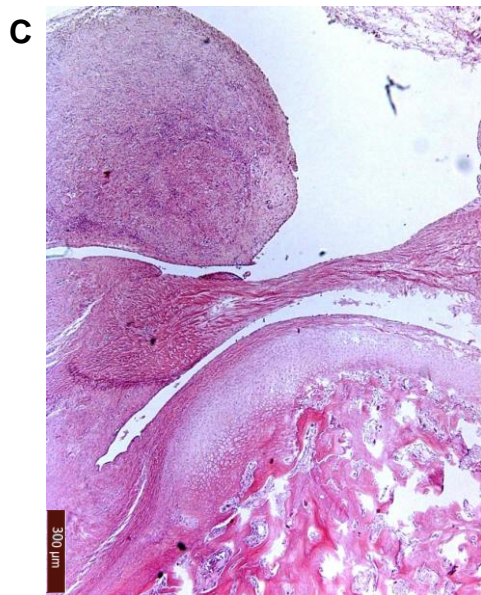
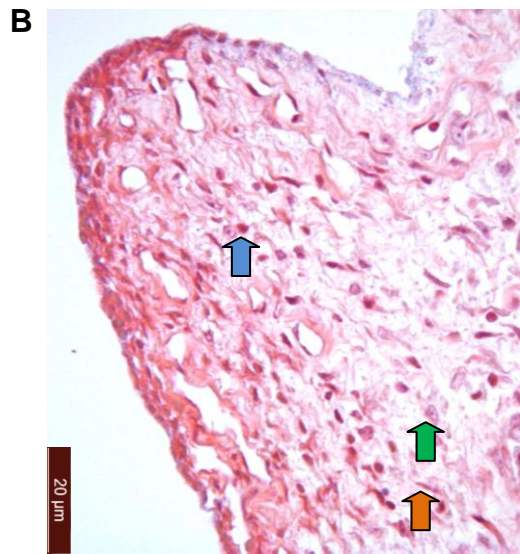
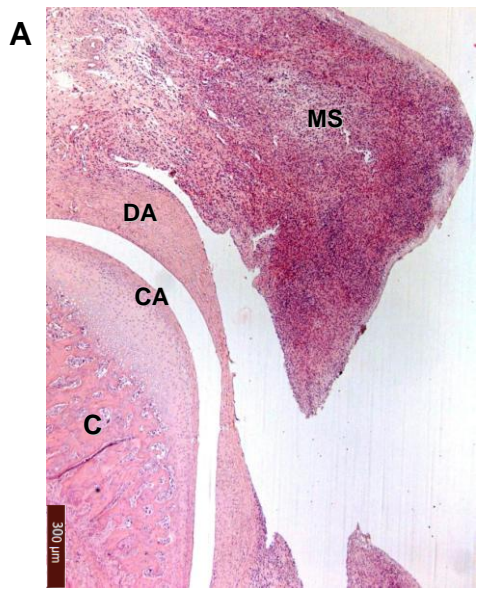


Figura 18. Fotomicrografias da análise histopatológica da ATM e de tecidos periarticulares. Os animais receberam 40 μ L de Zy 2 mg ou salina i.art na ATM, foram sacrificados nos tempos 10 d, 20 d e 30 d. (A): ATM de animais com artrite crônica no 10^o d após indução da artrite mostrando espessamento e fibrose da MS (40 x). (B): Membrana sinovial da ATM de animais no 10^o d após indução da artrite mostrando início de fibrose, neovascularização e infiltrado celular inflamatório com predominância de mononucleares (400 x). (C): ATM de animais com artrite crônica no 20^o d após indução da artrite mostrando espessamento e da fibrose na MS (40 x). (D): Membrana sinovial da ATM de animais no 20^o d após indução da artrite mostrando infiltrado celular inflamatório na MS destacando a presença de mononucleares e aumento do espessamento e fibrose na MS (400 x). (E): ATM de animais com artrite crônica no 30^o d após indução da artrite mostrando fibrose na MS (40 x). (F): Membrana sinovial da ATM de animais no 30^o d após indução da artrite mostrando infiltrado celular e destacando fibrose na MS (400 x). C: cabeça da mandíbula, CA: cartilagem articular, DA: disco articular, MS: membrana sinovial. Seta azul: células mononucleares; seta verde: fibroblastos; seta laranja: fibrócitos.

5.2. Efeito da administração de moduladores da via HO-1/BVD/CO na hipernocicepção articular e na artrite da ATM induzidas por Zy

5.2.1. Efeito da hemina, DMDC, biliverdina e ZnPP IX sobre hipernocicepção articular na artrite da ATM induzida por Zy

Para determinar se a indução ou inibição de HO-1 é capaz de modular a severidade da hipernocicepção articular na artrite da ATM induzida por Zy, animais foram pré-tratados com hemina, um substrato largamente utilizado como indutor da HO-1, para estudar a influência da atividade aumentada da via HO-1/BVD/CO. Em outra sequência de experimentos, animais receberam também doador de CO (DMDC) ou biliverdina, produtos finais da via enzimática de HO-1/BVD/CO. Para avaliar a influência de uma diminuição da atividade enzimática de HO-1, ZnPP IX foi administrado 1 h antes da indução da artrite na ATM por Zy, e a hipernocicepção articular foi aferida na 4^a h após indução da artrite.

A administração de hemina nas doses de 0,3 e 1 mg/kg foi capaz de aumentar significativamente ($p < 0,05$) o limiar mecânico de retirada da cabeça comparado ao grupo Zy 2 mg, assemelhando-se ao grupo sham, que recebeu apenas salina i.art. (**Figura 19**). Igualmente observado, DMDC nas doses de 0,25 e 2,5 $\mu\text{mol/kg}$ aumentou significativamente ($p < 0,05$) o limiar mecânico de retirada da cabeça comparado ao grupo Zy 2 mg, sendo a maior dose similar ao grupo sham, que recebeu apenas salina i.art. (**Figura 20**). Ademais, biliverdina em todas as doses aumentou significativamente ($p < 0,05$) o limiar mecânico de retirada da cabeça comparado ao grupo Zy 2 mg (**Figura 21**). Observa-se que o efeito antinociceptivo da indometacina foi similar ao da biliverdina, e foi sobrepujado pelas maiores doses de hemina e DMDC, apresentado resultado similar ao grupo sham, que recebeu apenas salina i-art.

Por outro lado, a administração de ZnPP IX em todas as doses foi capaz de reduzir significativamente ($p < 0,05$) o limiar mecânico de retirada da cabeça quando comparado ao grupo Zy 1mg (**Figura 22**). Observa-se que foi utilizada uma dose submáxima de Zy (1 mg) para ser possível identificar um aumento da hipernocicepção articular pela inibição da via HO-1/BVD/CO.

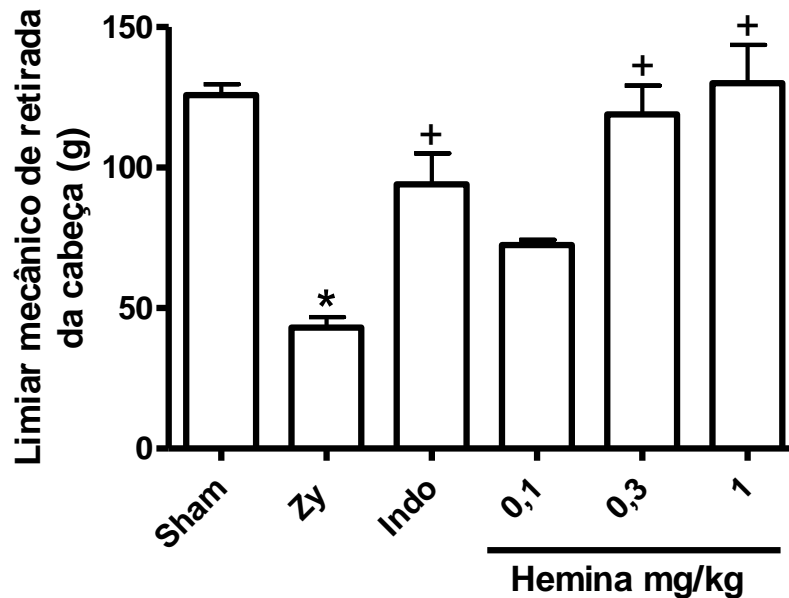


Figura 19. Efeito da administração de hemina sobre a hipernocicepção articular em ratos com artrite na ATM induzida por zymosan. Zy (2 mg; 40 μ L) foi injetado na ATM esquerda de ratos. O grupo sham recebeu 40 μ L solução salina i.art O limiar mecânico de retirada da cabeça foi mensurado antes e após a 4^a h da injeção intra-articular de Zy ou salina. Hemina nas doses de 0,1; 0,3 ou 1 mg/kg (s.c.) foi administrado 1 h antes da indução da artrite na ATM. Hemina 0,3 e 1 mg/kg aumentaram o limiar mecânico de retirada da cabeça. Os dados representam a média \pm epm (n=6). * $p < 0,05$ em relação ao grupo sham, + $p < 0,05$ em relação ao grupo Zy 2 mg (ANOVA, Bonferroni).

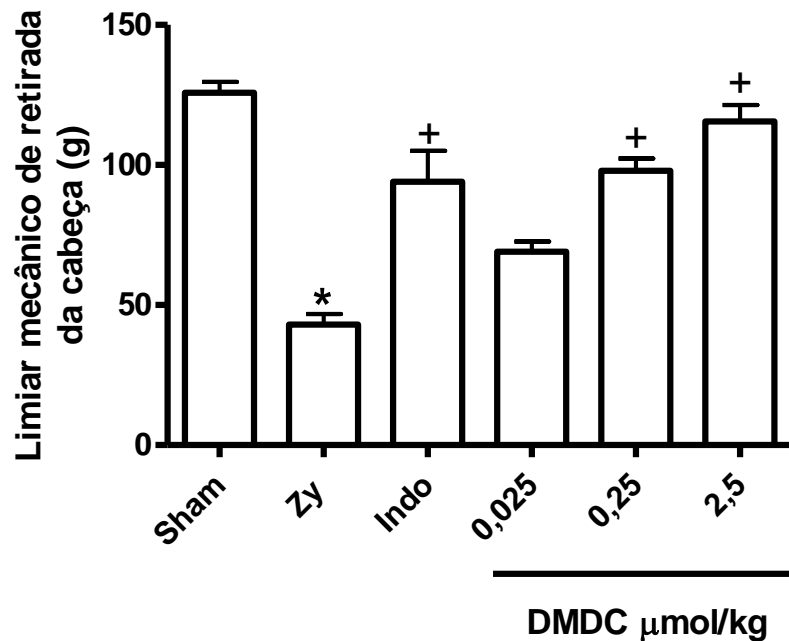


Figura 20. Efeito da administração de DMDC sobre a hipernociceção articular em ratos com artrite na ATM induzida por zymosan. Zy (2 mg; 40 μ L) foi injetado na ATM esquerda de ratos. O grupo sham recebeu 40 μ L solução salina i.art. O limiar mecânico de retirada da cabeça foi mensurado antes e após a 4^a h da injeção intra-articular de Zy ou salina. DMDC nas doses de 0,025; 0,25 ou 2,5 μ mol/kg (s.c.) foi administrado 1 h antes da indução da artrite na ATM. DMDC 0,25 e 2,5 μ mol/kg aumentaram o limiar mecânico de retirada da cabeça. Os dados representam a média \pm epm (n=6). * p < 0,05 em relação ao grupo sham, + p < 0,05 em relação ao grupo Zy 2 mg (ANOVA, Bonferroni).

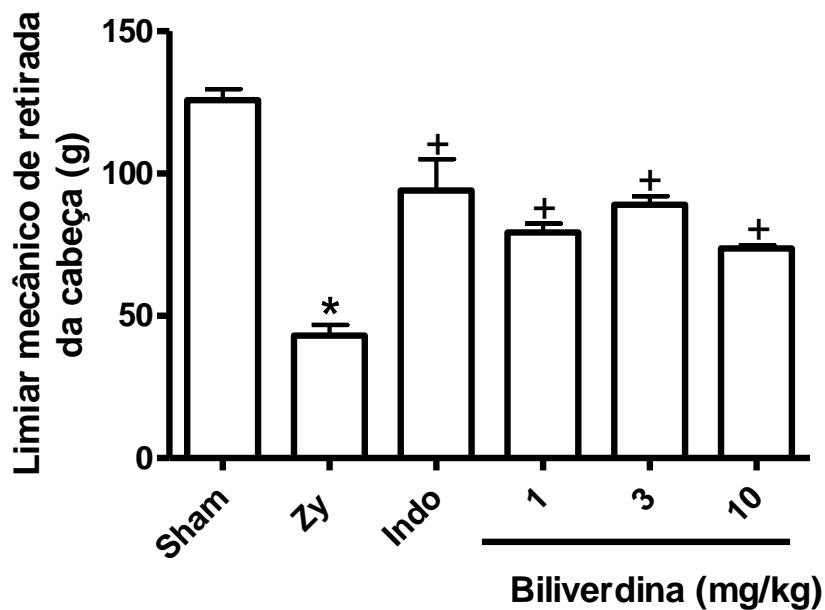


Figura 21. Efeito da administração de biliverdina sobre a hipernocicepção articular em ratos com artrite na ATM induzida por zymosan. Zy (2 mg; 40 μ L) foi injetado na ATM esquerda de ratos. O grupo sham recebeu 40 μ L solução salina i.art. O limiar mecânico de retirada da cabeça foi mensurado antes e após a 4^a h da injeção intra-articular de Zy ou salina. Biliverdina nas doses de 1, 3 ou 10 mg/kg (s.c.) foi administrado 1 h antes da indução da artrite na ATM. Biliverdina em todas as doses aumentou o limiar mecânico de retirada da cabeça. Os dados representam a média \pm epm (n=6). * $p < 0,05$ em relação ao grupo sham, † $p < 0,05$ em relação ao grupo Zy 2 mg (ANOVA, Bonferroni).

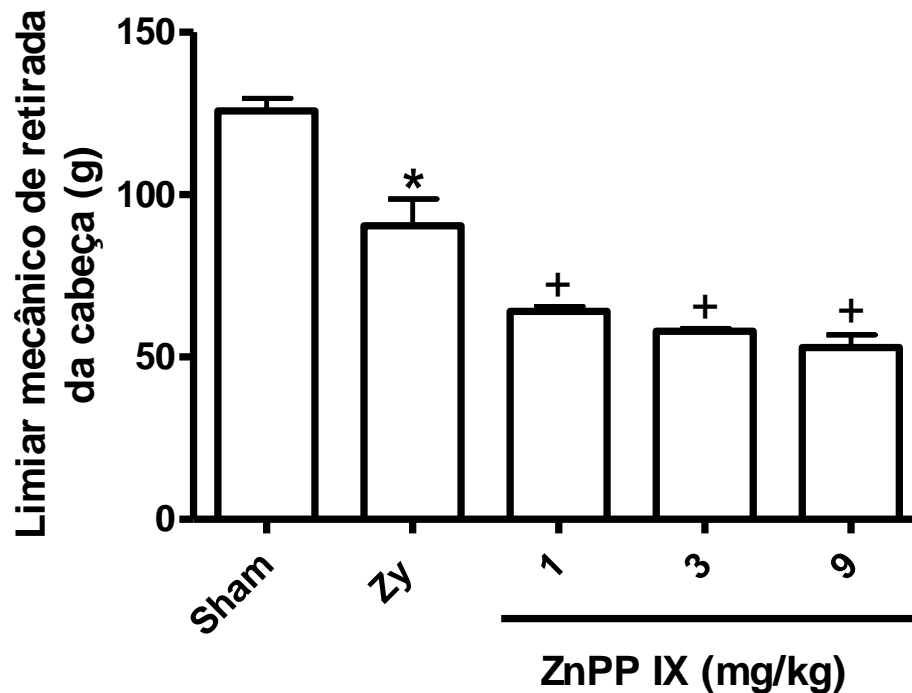


Figura 22. Efeito da administração de ZnPP IX sobre a hipernocicepção articular em ratos com artrite na ATM induzida por zymosan. Zy (1 mg; 40 μ L) foi injetado na ATM esquerda de ratos. O grupo sham recebeu 40 μ L solução salina i.art. O limiar mecânico de retirada da cabeça foi mensurado antes e após a 4^a h da injeção intra-articular de Zy ou salina. ZnPP IX nas doses de 1, 3 ou 9 mg/kg (s.c.) foi administrado 1 h antes da indução da artrite na ATM. ZnPP IX em todas as doses reduziu o limiar mecânico de retirada da cabeça. Os dados representam a média \pm epm (n=6). * $p < 0,05$ em relação ao grupo sham, ⁺ $p < 0,05$ em relação ao grupo Zy 1 mg (ANOVA, Bonferroni).

5.2.2. Efeito da hemina, DMDC, biliverdina e ZnPP IX sobre o influxo celular na artrite da ATM induzida por Zy

Para determinar se a indução ou inibição de HO-1 é capaz de modular a severidade da condição inflamatória na artrite da ATM induzida por Zy, animais foram pré-tratados com hemina, DMDC ou biliverdina. Para avaliar a influência de uma diminuição da atividade enzimática de HO-1, ZnPP IX foi administrado 1 h antes da indução da artrite na ATM por Zy, e os parâmetros foram avaliados na 6ª h após indução da artrite.

A administração de hemina nas doses de 0,3 e 1 mg/kg foi capaz de reduzir significativamente ($p < 0,05$) o número total de leucócitos do lavado sinovial comparado ao grupo Zy 2 mg (**Figura 23**). Igualmente, DMDC nas doses de 0,025; 0,25 e 2,5 $\mu\text{mol/kg}$ reduziu significativamente ($p < 0,05$) o número total de leucócitos do lavado sinovial comparado ao grupo Zy 2 mg (**Figura 24**). Ademais, biliverdina na dose de 10 mg/kg reduziu significativamente ($p < 0,05$) o número total de leucócitos do lavado sinovial comparado ao grupo Zy 2 mg (**Figura 25**). Em contrapartida, a administração de ZnPP IX na dose de 3 mg/kg foi capaz de aumentar significativamente ($p < 0,05$) o número total de leucócitos do lavado sinovial comparado ao grupo Zy 1mg (**Figura 26**).

Certificando que esse influxo celular era composto principalmente de polimorfonucleares, foi realizada dosagem da atividade de mieloperoxidase (MPO), uma enzima presente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos. Observou-se que Zy 2 mg foi capaz de aumentar significativamente ($p < 0,05$) a atividade de MPO quando comparado ao grupo sham, e que hemina (1 mg/kg), DMDC (2,5 $\mu\text{mol/kg}$) e biliverdina (10 mg/kg) reduziram de forma significante ($p < 0,05$) a atividade de MPO quando comparado ao grupo Zy 2 mg (**Figura 27**). ZnPP IX na dose de 3 mg/kg, entretanto, causou um aumento significante ($p < 0,05$) da atividade de MPO quando comparado à dose submáxima de Zy, 1 mg (**Figura 28**).

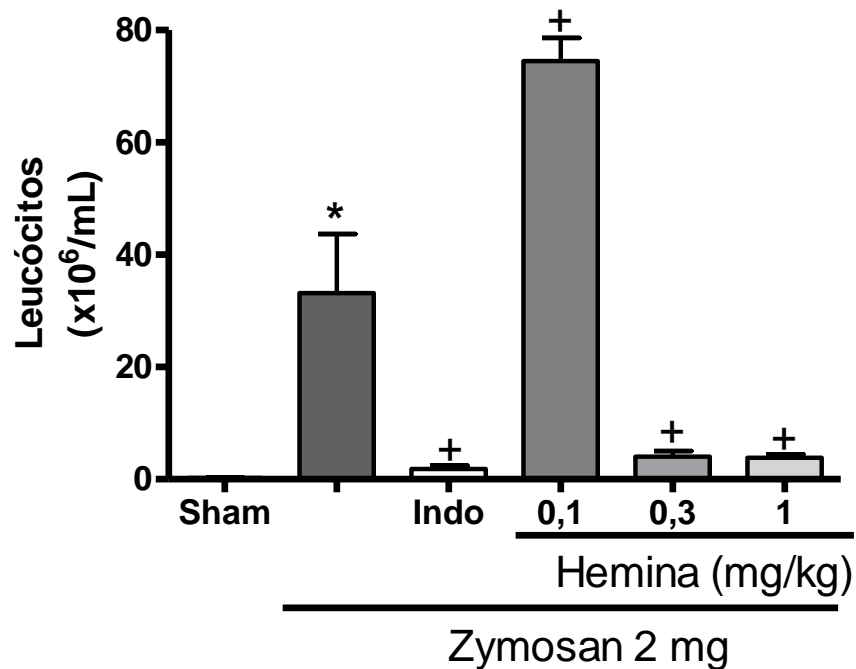


Figura 23. Efeito da administração de hemina sobre a contagem total de leucócitos em ratos com artrite na ATM induzida por zymosan. Zy (2 mg; 40 μ L) foi injetado na ATM esquerda de ratos. O grupo sham recebeu 40 μ L solução salina i.art. A contagem total do número de leucócitos foi realizada na 6^a h da injeção intra-articular de Zy ou salina. Hemina nas doses de 0,1; 0,3 ou 1 mg/kg (s.c.) foi administrado 1 h antes da indução da artrite na ATM. Hemina 0,3 e 1 mg/kg reduziram o número total de leucócitos do lavado sinovial. Os dados representam a média \pm epm (n=6). * $p < 0,05$ em relação ao grupo sham, † $p < 0,05$ em relação ao grupo Zymosan 2 mg (ANOVA, Bonferroni).

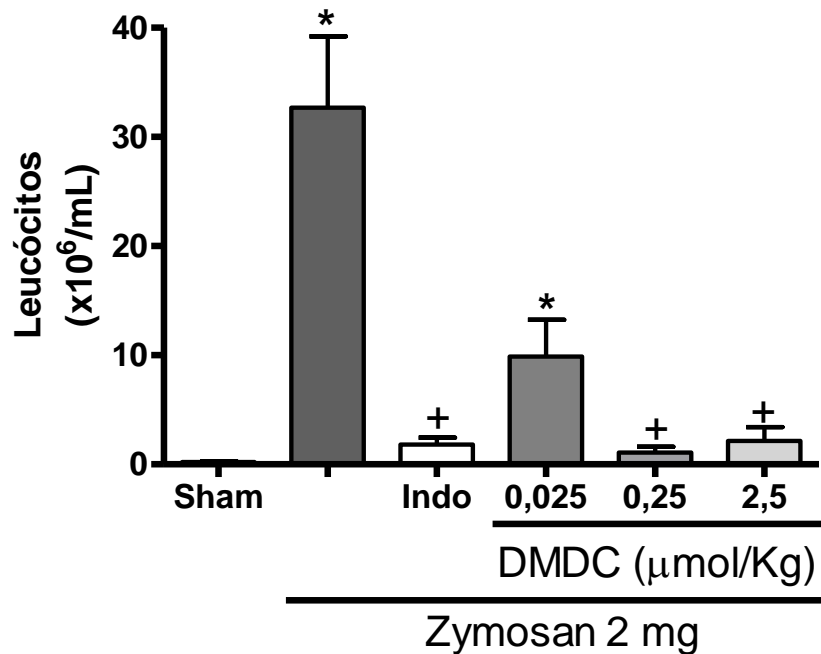


Figura 24. Efeito da administração de DMDC sobre a contagem total de leucócitos em ratos com artrite na ATM induzida por zymosan. Zy (2 mg; 40 μ L) foi injetado na ATM esquerda de ratos. O grupo sham recebeu 40 μ L solução salina i.art. A contagem total do número de leucócitos foi realizada na 6^a h da injeção intra-articular de Zy ou salina. DMDC nas doses de 0,025; 0,25 ou 2,5 μ mol/kg (s.c.) foi administrado 1 h antes da indução da artrite na ATM. DMDC em todas as doses reduziu o número total de leucócitos do lavado sinovial. Os dados representam a média \pm epm (n=6). * p < 0,05 em relação ao grupo sham, + p < 0,05 em relação ao grupo Zymosan 2 mg (ANOVA, Bonferroni).

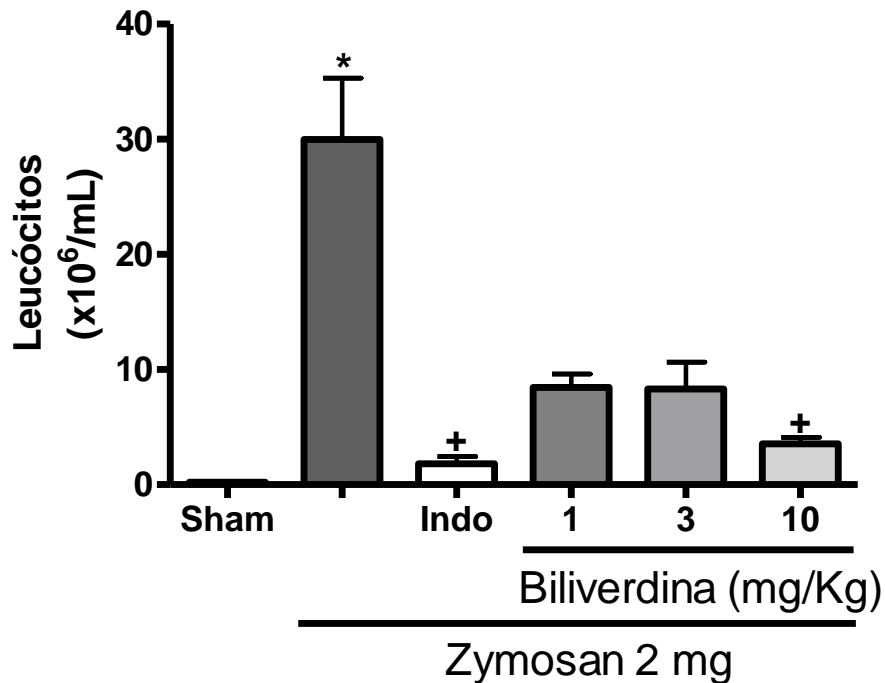


Figura 25. Efeito da administração de biliverdina sobre a contagem total de leucócitos em ratos com artrite na ATM induzida por zymosan. Zy (2 mg; 40 μ L) foi injetado na ATM esquerda de ratos. O grupo sham recebeu 40 μ L solução salina i.art. A contagem total do número de leucócitos foi realizada na 6^a h da injeção intra-articular de Zy ou salina. Bliverdina nas doses de 1, 3 ou 10 mg/kg (s.c.) foi administrado 1 h antes da indução da artrite na ATM. Bliverdina 10 mg/kg reduziu o número total de leucócitos do lavado sinovial. Os dados representam a média \pm epm (n=6). * p < 0,05 em relação ao grupo sham, + p < 0,05 em relação ao grupo Zymosan 2 mg (ANOVA, Bonferroni).

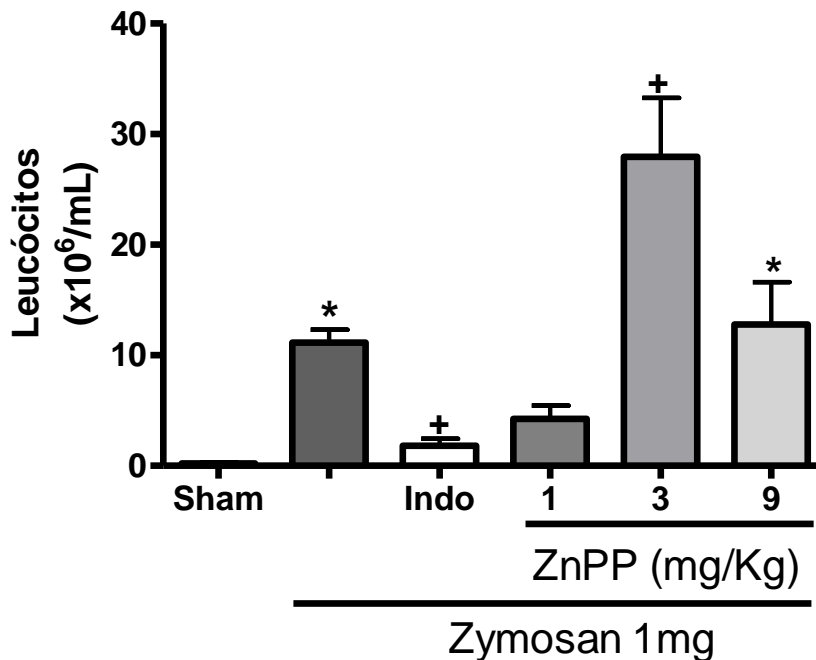


Figura 26. Efeito da administração de ZnPP IX sobre a contagem total de leucócitos em ratos com artrite na ATM induzida por zymosan. Zy (1 mg; 40 μ L) foi injetado na ATM esquerda de ratos. O grupo sham recebeu 40 μ L solução salina i.art. A contagem total do número de leucócitos foi realizada na 6^a h da injeção intra-articular de Zy ou salina. ZnPP IX nas doses de 1, 3 ou 9 mg/kg (s.c.) foi administrado 1 h antes da indução da artrite na ATM. ZnPP IX 3 mg/kg foi aumentou o número total de leucócitos do lavado sinovial. Os dados representam a média \pm epm (n=6). * $p < 0,05$ em relação ao grupo sham, + $p < 0,05$ em relação ao grupo Zymosan 1 mg (ANOVA, Bonferroni).

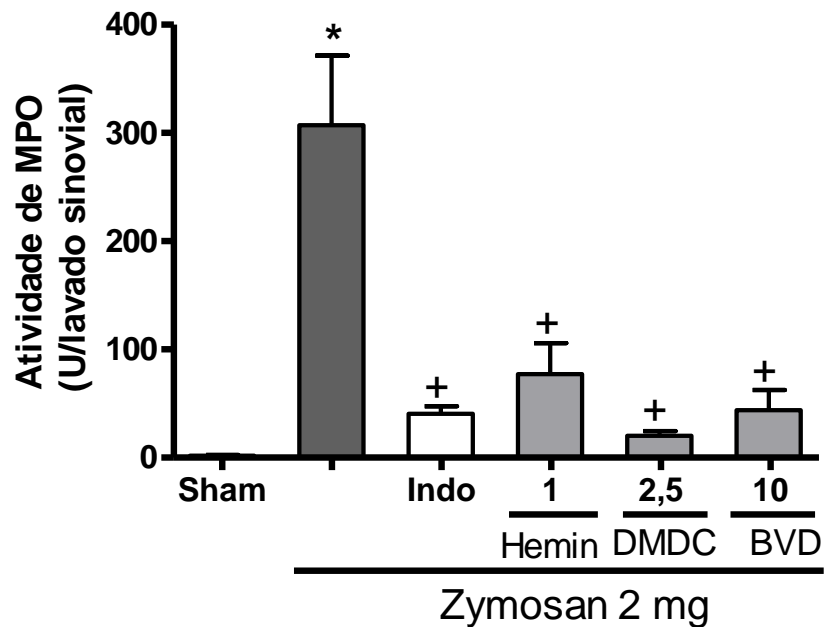


Figura 27. Efeito da administração de hemina, DMDC e biliverdina sobre a atividade de mieloperoxidase do lavado sinovial na artrite da ATM de ratos induzida por zymosan. Zy (2 mg; 40 μ L) foi injetado na ATM esquerda de ratos. O grupo sham recebeu 40 μ L solução salina i.art. A atividade de MPO no lavado sinovial foi avaliada na 6^a h após a injeção intra-articular de Zy ou salina. Hemina 1 mg/kg, DMDC 2,5 μ mol/kg e biliverdina 10 mg/kg (s.c.) foram administrados 1 h antes da indução da artrite na ATM, e reduziram a atividade de MPO na 6^a h após indução da artrite. Os dados representam a média \pm epm (n=6). * p < 0,05 em relação ao grupo sham, + p < 0,05 em relação ao grupo Zymosan 2 mg (ANOVA, Bonferroni).

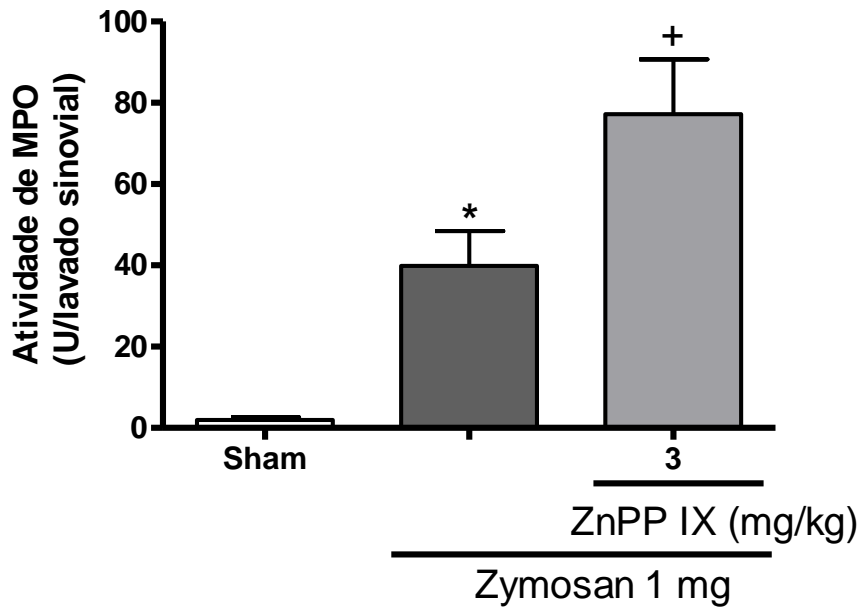


Figura 28. Efeito da administração de ZnPP IX sobre a atividade de mieloperoxidase do lavado sinovial na artrite da ATM de ratos induzida por zymosan. Zy (1 mg; 40 μ L) foi injetado na ATM esquerda de ratos. O grupo sham recebeu 40 μ L solução salina i.art. A atividade de MPO no lavado sinovial foi avaliada na 6^a h após a injeção intra-articular de Zy ou salina. ZnPP IX 3 mg/kg (s.c.) foi administrado 1 h antes da indução da artrite na ATM, e aumentou a atividade de MPO na 6^a h após indução da artrite. Os dados representam a média \pm epm (n=6). * $p < 0,05$ em relação ao grupo sham, + $p < 0,05$ em relação ao grupo Zymosan 1 mg (ANOVA, Bonferroni).

5.2.3. Análise histopatológica do efeito da hemina, DMDC, biliverdina e ZnPP IX na artrite da ATM induzida por Zy

Na 6^a h após a indução da artrite por Zy 2 mg, influxo celular foi observado na membrana sinovial, no tecido periarticular e no tecido muscular estriado (**figura 29 C, D**), comparado ao grupo sham (**figura 29 A, B**). Os tipos celulares predominantes são neutrófilos caracterizando a inflamação aguda (**figura 29 C, D**).

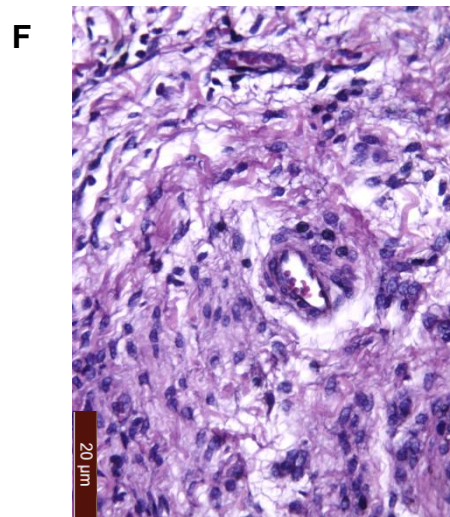
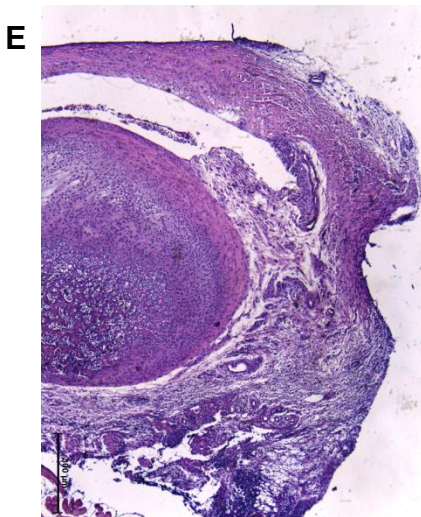
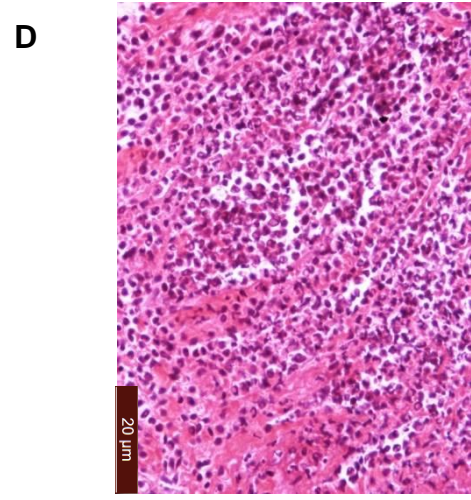
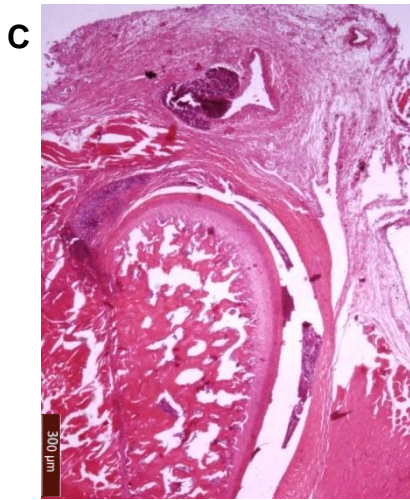
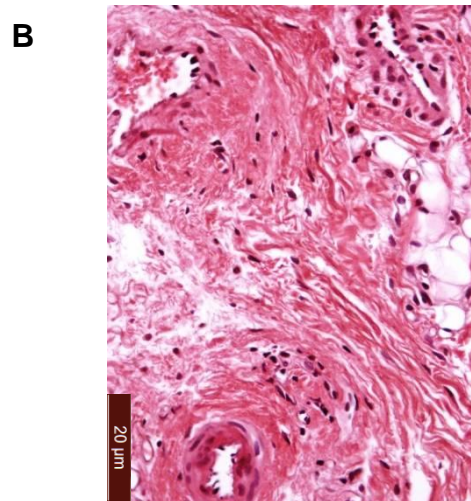
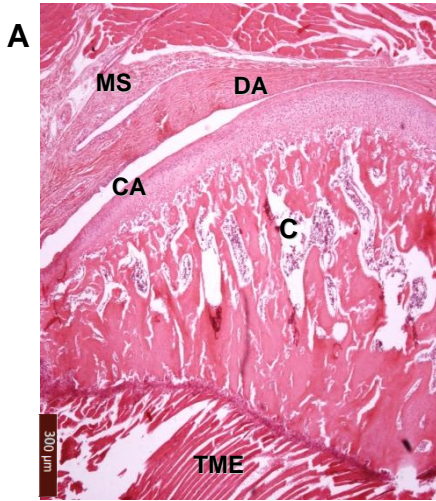
A análise histopatológica mostrou que hemina 1 mg/kg (**figura 29 E, F**), DMDC 2,5 µmol/kg (**figura 29 G, H**) e biliverdina 10 mg/kg (**figura 29 I, J**) reduziram o quadro inflamatório na ATM de ratos na 6^a h após indução da artrite por Zy 2 mg observado pelo decréscimo no infiltrado celular da membrana sinovial (MS), do tecido conjuntivo periarticular e do tecido muscular estriado. ZnPP IX 3 mg/kg (s.c.), entretanto, aumentou o infiltrado celular inflamatório e o edema da membrana sinovial (MS) e no tecido muscular estriado (**figura 29 K, L**).

A tabela 3 apresenta os escores atribuídos à análise histopatológica das ATM comparando valores entre grupos sham, grupos com artrite na ATM induzida por Zy e grupos tratados com Hemina 1 mg/kg, DMDC 2,5 µmol/kg, bliverdina 10 mg/kg e ZnPP IX 3 mg/kg (s.c.) artrite através das colorações hematoxilina-eosina (HE). Escores de 0 a 4 foram atribuídos conforme aumento do infiltrado celular inflamatório. Observou-se significativo aumento dos parâmetros inflamatórios nos grupos Zy comparado ao grupo sham ($p < 0,05$), redução dos parâmetros inflamatórios nos grupos Hemina 1 mg/kg, DMDC 2,5 µmol/kg e biliverdina 10 mg/kg comparado ao grupo Zy 2 mg ($p < 0,05$), e aumento dos parâmetros inflamatórios no grupo ZnPP IX 3 mg/kg comparado ao grupo Zy 1 mg.

Tabela 3. Efeito da administração de hemina, DMDC, biliverdina e ZnPP IX sobre análise histopatológica da artrite na ATM de ratos induzida por zymosan através da coloração pelo método HE.

	Infiltrado celular MS	Infiltrado celular tec periarticular	Infiltrado celular tec muscular
Sham	0(0-0)	0(0-0)	0(0-0)
Zy 2 mg	2,5 (1-3)*	4 (4-4)*	3 (2-4)*
Hemina 1 mg/kg	0,5 (0-1) ⁺	1 (0-2) ⁺	1,5(1-3) ⁺
DMDC 2,5 µmol/kg	1 (1-2) ⁺	2,5 (1-4) ⁺	1,5 (1-3) ⁺
Biliverdina 10 mg/kg	1 (0-2) ⁺	1 (0-2) ⁺	1 (0-2) ⁺
Zy 1 mg	2 (2-2)*	4 (2-4)*	1 (1-2)*
ZnPP 3 mg/kg	4 (3-4) ⁺	4 (4-4) ⁺	3,5 (3-4) ⁺

* $p < 0,05$ em relação ao grupo sham, ⁺ $p < 0,05$ em relação ao grupo Zy 2 mg ou Zy 1 mg (Kruskal-Wallis, Dunn's). MS: membrana sinovial.



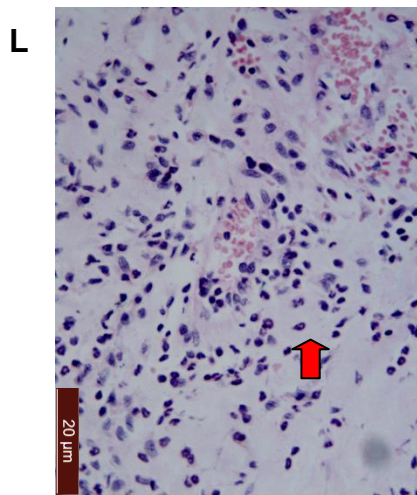
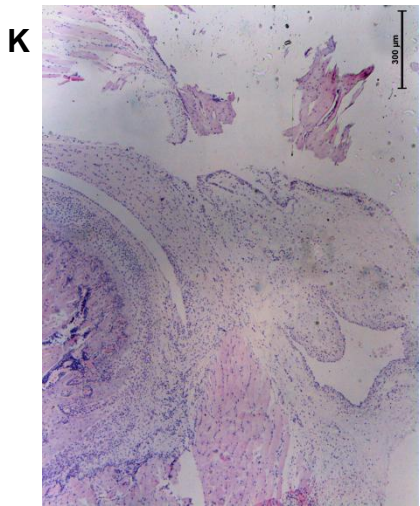
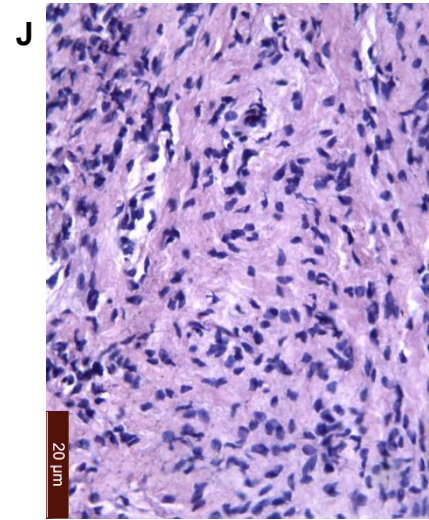
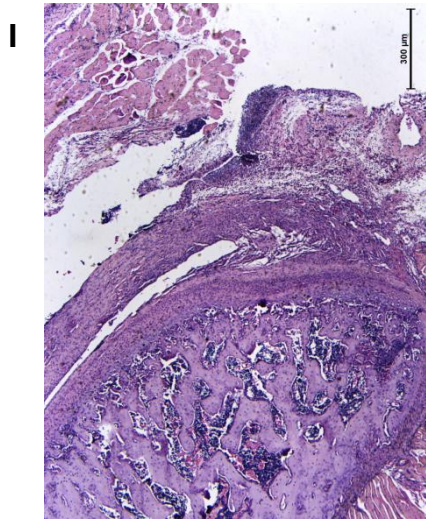
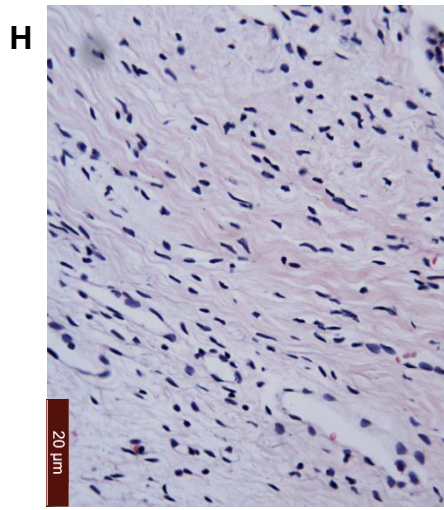
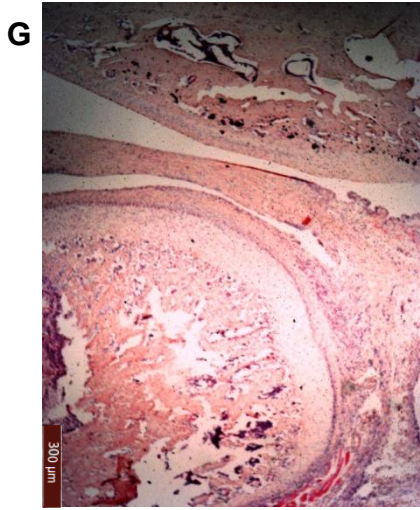


Figura 29. Fotomicrografias da ATM e de tecidos periarticulares do efeito da hemina, DMDC, biliverdina e ZnPP IX na artrite da ATM induzida por Zy. (A): ATM de animais sham (40 x). (B): Membrana sinovial da ATM de animais sham (400 x). (C): ATM de animais com artrite aguda na 6ª h após indução da artrite mostrando infiltrado celular inflamatório na MS, no tecido conjuntivo periarticular, no tecido muscular estriado e espessamento da MS (40 x). (D) Membrana sinovial da ATM de animais na 6ª h após indução da artrite mostrando edema e infiltrado celular inflamatório com predominância de polimorfonucleares (400 x). (E): ATM de animais com artrite que receberam Hemina 1 mg/kg, mostrando redução de infiltrado celular inflamatório (40 x). (F): Membrana sinovial da ATM de animais com artrite que receberam Hemina 1 mg/kg, mostrando redução de infiltrado celular inflamatório na membrana sinovial (400 x). (G): ATM de animais com artrite que receberam DMDC 2,5 µmol/kg, mostrando redução de infiltrado celular inflamatório (40 x). (H): Membrana sinovial da ATM de animais com artrite que receberam DMDC 2,5 µmol/kg, mostrando redução de infiltrado celular inflamatório na membrana sinovial (400 x). (I): ATM de animais com artrite que receberam biliverdina 10 mg/kg, mostrando redução de infiltrado celular inflamatório (40 x). (J): Membrana sinovial da ATM de animais com artrite que receberam bliverdina 10 mg/kg, mostrando redução de infiltrado celular inflamatório na membrana sinovial (400 x). (K): ATM de animais com artrite que receberam ZnPP IX 3 mg/kg, mostrando aumento de infiltrado celular inflamatório (40 x). (L): Membrana sinovial da ATM de animais com artrite que receberam ZnPP IX 3 mg/kg, mostrando aumento de infiltrado celular inflamatório e edema na membrana sinovial (400 x). C: côndilo; CA: cartilagem articular; DA: disco articular; MS: membrana sinovial; TME: tecido muscular estriado. Seta vermelha: edema.

5.3. Estudo do envolvimento da via HO-1/CO/GMPc/canal de K⁺ sensível a ATP na redução da hipernocicepção articular da artrite da ATM induzida por Zy

Para estudar se a via HO-1/CO/GMPc/canal de K⁺ sensível a ATP corresponde ao mecanismo de ação antinociceptivo, foi utilizado ODQ, um inibidor seletivo da guanilato ciclase solúvel (GCs), e glibenclamida, um bloqueador de canal de K⁺ sensível a ATP previamente à administração de DMDC, um doador de CO.

Observou-se que Zy 2 mg foi capaz de reduzir significativamente ($p < 0,05$) o limiar mecânico de retirada da cabeça comparado ao grupo sham, e que DMDC 2,5 $\mu\text{mol/kg}$ (s.c.) foi capaz de reverter a hipernocicepção articular de forma significativa ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo Zy 2 mg (**figura 30**). Quando administrados previamente ao DMDC, ODQ 12,5 $\mu\text{mol/kg}$ (s.c.) e glibenclamida 10 mg/kg (i.p.) reverteram de forma significativa ($p < 0,05$) a ação antinociceptiva do DMDC, resultando em redução do limiar mecânico de retirada da cabeça (**figura 30**).

Ademais, observou-se que a administração prévia de ODQ 12,5 $\mu\text{mol/kg}$ e glibenclamida 10 mg/kg ao DMDC 2,5 $\mu\text{mol/kg}$ foi capaz de reverter o efeito anti-inflamatório do DMDC, resultando em aumento significativo ($p < 0,05$) do número de leucócitos (**figura 31**). Certificando que essa ação se deu principalmente devido à inibição de polimorfonucleares, também se observou aumento significativo ($p < 0,05$) na atividade de MPO dos grupos ODQ 12,5 $\mu\text{mol/kg}$ e glibenclamida 10 mg/kg quando comparado ao grupo DMDC 2,5 $\mu\text{mol/kg}$ (**figura 32**).

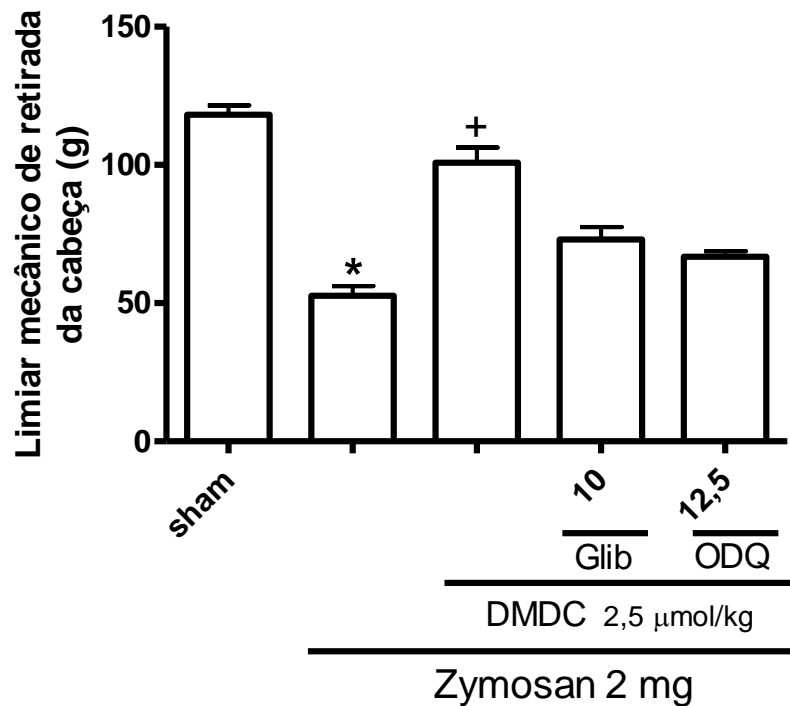


Figura 30. Efeito da administração de moduladores da via HO-1/CO/GMPc/canal de K⁺ sensível a ATP sobre a hipernocicepção articular em ratos com artrite na ATM induzida por zymosan. Zy (2 mg; 40 µL) foi injetado na ATM esquerda de ratos. O grupo sham recebeu 40 µL solução salina i.art. O limiar mecânico de retirada da cabeça foi mensurado antes e após a 4^a h da injeção intra-articular de Zy ou salina. DMDC 2,5 µmol/kg (s.c.) foi administrado 1 h antes da indução da artrite na ATM. Glibenclamida 10 mg/kg (i.p.) foi administrado 30 min antes do DMDC. ODQ 12,5 µmol/kg (s.c.) foi administrado 1 h antes do DMDC. Glibenclamida 10 mg/kg e ODQ 12,5 µmol/kg reduziram o limiar mecânico de retirada da cabeça. Os dados representam a média ± epm (n=6). **p* < 0,05 em relação ao grupo DMDC (ANOVA, Bonferroni).

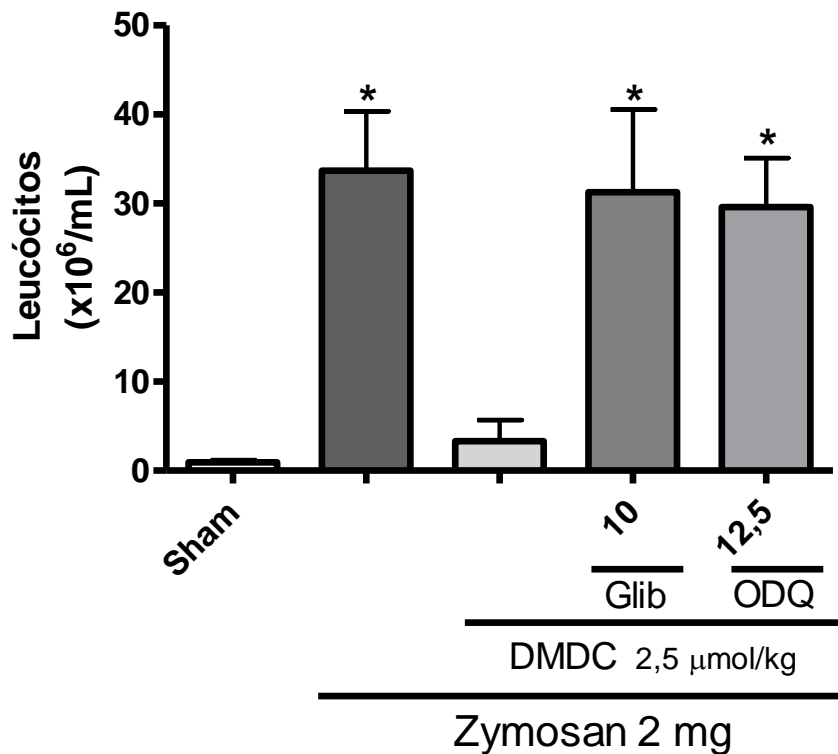


Figura 31. Efeito da administração de moduladores da via HO-1/CO/GMPc/canal de K⁺ sensível a ATP sobre a contagem total de leucócitos em ratos com artrite na ATM induzida por zymosan. Zy (2 mg; 40 µL) foi injetado na ATM esquerda de ratos. O grupo sham recebeu 40 µL solução salina i.art. A contagem total do número de leucócitos foi realizada na 6^a h da injeção intra-articular de Zy ou salina. DMDC 2,5 µmol/kg (s.c.) foi administrado 1 h antes da indução da artrite na ATM. Glibenclamida 10 mg/kg (i.p.) foi administrado 30 min antes do DMDC. ODQ 12,5 µmol/kg (s.c.) foi administrado 1 h antes do DMDC. Glibenclamida 10 mg/kg e ODQ 12,5 µmol/kg aumentaram a contagem total do número de leucócitos no lavado sinovial. Os dados representam a média ± epm (n=6). **p* < 0,05 em relação ao grupo DMDC (ANOVA, Bonferroni).

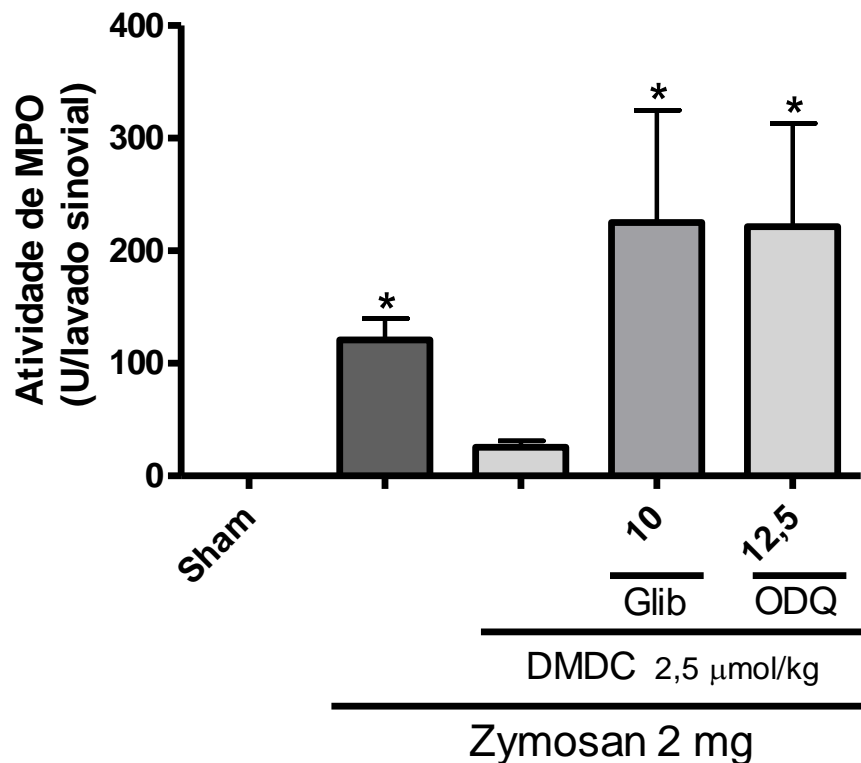


Figura 32. Efeito da administração de moduladores da via HO-1/CO/GMPc/canal de K⁺ sensível a ATP sobre a atividade de mieloperoxidase do lavado sinovial na artrite da ATM de ratos induzida por zymosan. Zy (2 mg; 40 µL) foi injetado na ATM esquerda de ratos. O grupo sham recebeu 40 µL solução salina i.art. A atividade de MPO no lavado sinovial foi avaliada na 6^a h após a injeção intra-articular de Zy ou salina. DMDC 2,5 µmol/kg (s.c.) foi administrado 1 h antes da indução da artrite na ATM. Glibenclamida 10 mg/kg (i.p.) foi administrado 30 min antes do DMDC. ODQ 12,5 µmol/kg (s.c.) foi administrado 1 h antes do DMDC. Glibenclamida 10 mg/kg e ODQ 12,5 µmol/kg aumentaram a atividade de MPO. Os

dados representam a média \pm epm (n=6). * $p < 0,05$ em relação ao grupo DMDC (ANOVA, Bonferroni).

5.4. Análise do curso-temporal da expressão do RNAm para HO-1, TNF α e IL-1 β em tecidos da ATM e do gânglio trigeminal de ratos com artrite na ATM induzida por Zy

Para estudar o curso-temporal da expressão gênica de HO-1 e a interligação temporal da via HO-1/BDV/CO com a expressão gênica de dois importantes mediadores inflamatórios, TNF α e IL-1 β , foi realizado o estudo tanto de tecidos articulares da ATM de ratos, quanto do gânglio trigeminal, local onde se situam os corpos celulares dos neurônios aferentes primários.

5.4.1. Extração do RNA total

Para a extração do RNA total utilizou-se tecidos da ATM e do gânglio trigeminal de ratos submetidos à indução da artrite por Zy (2 mg/art.; 40 μ L) e do grupo sham, que recebeu 40 μ L solução salina i.art. Foram utilizados apenas os RNA que apresentaram resultados satisfatórios de concentração, variando entre 848 e 1233 ng/ μ l, e de qualidade, observada pela relação de absorbância 260/280 nm acima de 1,7 (SAMBROOK *et al.*, 1989). Podemos observar os valores de concentração de RNA para tecidos da ATM (**Tabela 4**) e para tecidos do gânglio trigeminal (**Tabela 5**), além da presença de bandas dos RNAs ribossômicos 28S e 18S íntegros (visíveis em gel de eletroforese), como pode ser observado na **Figura 33** para tecidos da ATM e na **Figura 34** para tecidos do gânglio trigeminal.

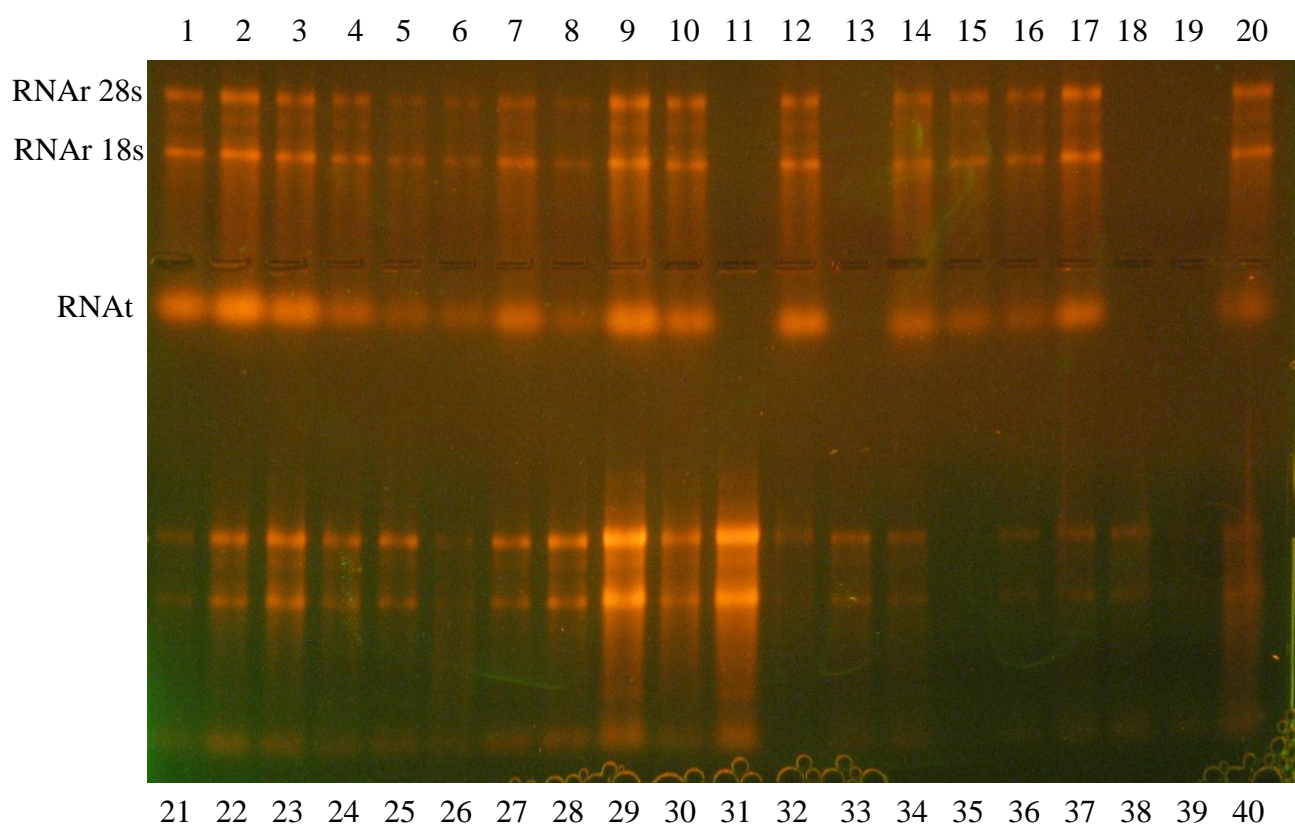


Figura 33. Análise da qualidade do RNA total por eletroforese em gel obtido de tecidos da ATM. Grupo que recebeu salina (i.art.; 40 μ L) na ATM e foram sacrificados na 3^a h (1-4); grupo que recebeu Zy 2mg (i.art.; 40 μ L) na ATM e foram sacrificados na 3^a h (5-8); grupo que recebeu salina (i.art.; 40 μ L) na ATM e foram sacrificados na 6^a h (9-12); grupo que recebeu Zy 2mg (i.art.; 40 μ L) na ATM e foram sacrificados na 6^a h (13-16); grupo que recebeu salina (i.art.; 40 μ L) na ATM e foram sacrificados na 9^a h (17-20); grupo que recebeu Zy 2mg (i.art.; 40 μ L) na ATM e foram sacrificados na 6^a h (21-24); grupo que recebeu salina (i.art.; 40 μ L) na ATM e foram sacrificados na 9^a h (25-28); grupo que recebeu Zy 2mg (i.art.; 40 μ L) na ATM e foram sacrificados na 9^a h (29-32); grupo que recebeu Zy 2mg (i.art.; 40 μ L) na ATM e foram sacrificados na 12^a h (33-36); grupo que recebeu Zy 2mg (i.art.; 40 μ L) na ATM e foram sacrificados na 24^a h (37-40).

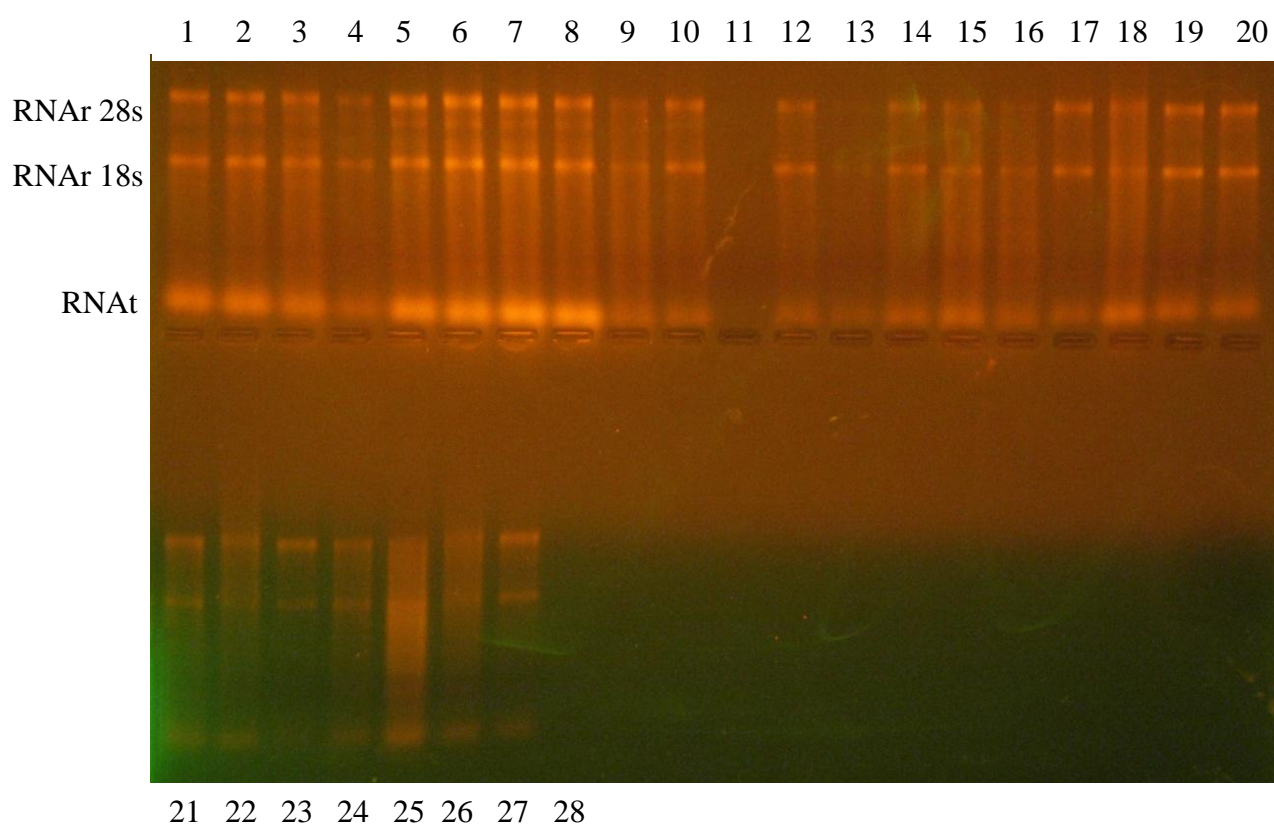


Figura 34. Análise da qualidade do RNA total por eletroforese em gel obtido de tecido do gânglio trigeminal. Grupo que recebeu salina (i.art.; 40 μ L) na ATM e foram sacrificados na 3^a h (1-4); grupo que recebeu Zy 2mg (i.art.; 40 μ L) na ATM e foram sacrificados na 3^a h (5-8); grupo que recebeu salina (i.art.; 40 μ L) na ATM e foram sacrificados na 6^a h (9-12); grupo que recebeu Zy 2mg (i.art.; 40 μ L) na ATM e foram sacrificados na 6^a h (13-16); grupo que recebeu Zy 2mg (i.art.; 40 μ L) na ATM e foram sacrificados na 9^a h (17-20); grupo que recebeu Zy 2mg (i.art.; 40 μ L) na ATM e foram sacrificados na 12^a h (21-24); grupo que recebeu Zy 2mg (i.art.; 40 μ L) na ATM e foram sacrificados na 24^a h (25-28).

Tabela 4. Quantificação do RNA total extraído do tecido da ATM de ratos.

		Concentração		
Grupo 3h	Identificação	ng/μl	AB260	AB260/280
Sham	1	876	0,438	1,564
Sham	3	972	0,486	1,676
Sham	4	756	0,378	1,530
Sham	5	872	0,436	1,552
Zy	1	750	0,375	1,476
Zy	2	1004	0,502	1,438
Zy	3	914	0,457	1,549
Zy	4	2378	1,189	1,254
		Concentração		
Grupo 6h	Identificação	ng/μl	AB260	AB260/280
Sham	1	1064	0,532	1,880
Sham	3	970	0,485	1,622
Sham	4	1148	0,574	1,573
Sham	5	1130	0,565	1,544
Zy	1	1045	0,418	1,484
Zy	2	848	0,339	1,719
Zy	3	983	0,393	1,589
Zy	4	1143	0,457	1,543
		Concentração		
Grupo 9h	Identificação	ng/μl	AB260	AB260/280
Sham	1	1356	0,678	1,584
Sham	3	1100	0,550	1,528
Sham	4	934	0,467	1,390
Sham	5	1280	0,640	1,531
Zy	1	836	0,410	1,384
Zy	2	1232	0,616	1,540
Zy	3	918	0,458	1,525
Zy	4	1216	0,608	1,437
		Concentração		
Grupo 12h	Identificação	ng/μl	AB260	AB260/280
Sham	1	1858	0,929	1,410
Sham	3	1224	0,610	1,430
Sham	4	1088	0,544	1,443
Sham	5	1256	0,628	1,558
Zy	1	1280	0,640	1,608
Zy	2	1330	0,665	1,515
Zy	3	2042	1,021	1,513
Zy	4	1924	0,962	1,400
		Concentração		
Grupo 24h	Identificação	ng/μl	AB260	AB260/280
Sham	1	1196	0,598	1,448
Sham	3	1122	0,561	1,488
Sham	4	1776	0,888	1,485
Sham	5	1560	0,780	1,554
Zy	1	3138	1,569	1,422
Zy	2	1790	0,895	1,559
Zy	3	2082	1,041	1,614
Zy	4	854	0,427	1,488

Tabela 5. Quantificação do RNA total extraído do gânglio trigeminal de ratos.

		Concentração		
Grupo 3h	Identificação	ng/ μ l	AB260	AB260/280
Sham	1	512	0,256	1,255
Sham	3	426	0,213	1,323
Sham	4	648	0,324	1,373
Sham	5	648	0,324	1,385
Zy	1	1724	0,862	1,121
Zy	2	624	0,312	1,368
Zy	3	546	0,273	1,213
Zy	4	348	0,314	1,370
		Concentração		
Grupo 6h	Identificação	ng/ μ l	AB260	AB260/280
Sham	1	796	0,398	1,513
Sham	3	912	0,456	1,634
Sham	4	778	0,389	1,556
Sham	5	940	0,047	1,808
Zy	1	382	0,191	1,492
Zy	2	140	0,070	1,892
Zy	3	162	0,081	1,500
Zy	4	356	0,178	1,712
		Concentração		
Grupo 9h	Identificação	ng/ μ l	AB260	AB260/280
Sham	1	780	0,378	1,515
Sham	3	906	0,465	1,644
Sham	4	770	0,399	1,526
Sham	5	930	0,147	1,810
Zy	1	628	0,314	1,319
Zy	2	636	0,318	1,413
Zy	3	626	0,313	1,338
Zy	4	1192	0,596	1,324
		Concentração		
Grupo 12h	Identificação	ng/ μ l	AB260	AB260/280
Sham	1	760	0,389	1,515
Sham	3	890	0,457	1,599
Sham	4	770	0,400	1,545
Sham	5	910	0,285	1,710
Zy	1	888	0,444	1,233
Zy	2	904	0,452	1,314
Zy	3	672	0,336	1,297
Zy	4	646	0,323	1,351
		Concentração		
Grupo24	Identificação	ng/ μ l	AB260	AB260/280
Sham	1	768	0,395	1,464
Sham	3	812	0,421	1,517
Sham	4	560	0,266	1,424
Sham	5	435	0,225	1,288
Zy	1	788	0,394	1,465
Zy	2	800	0,400	1,487
Zy	3	550	0,275	1,403
Zy	4	454	0,227	1,297

5.4.2. Avaliação dos *primers* para os genes HO-1, TNF α , IL-1 β e GAPDH

A técnica de qRT-PCR foi utilizada devido a sua sensibilidade e eficiência em análises de expressões de genes, e os genes utilizados foram de HO-1, TNF- α e IL-1 β (genes-alvo) e GAPDH (gene de controle endógeno - *housekeeping*). Apesar da técnica de qRT-PCR ser sensível, esta ferramenta necessita de otimizações e normalizações para uma melhor veracidade e qualidade de resultados em cada tipo específico de modelo de estudo (WONG; MEDRANO, 2005).

Para garantir as melhores condições experimentais na aplicação desta técnica, os *primers* utilizados para os genes alvos, HO-1, TNF- α , IL-1 β e do controle endógeno GAPDH, foram desenvolvidos sob a junção éxon-éxon, impossibilitando, desta forma, a amplificação de DNA genômico, que superestimaria um resultado de PCR. Também suas sequências foram desenhadas de modo a obter total especificidade para o animal utilizado no estudo (*Rattus norvegicus albinus*), impossibilitando uma provável amplificação de um contaminante existente.

5.4.3. Estudo do curso-temporal da expressão do RNAm para HO-1, TNF α e IL-1 β em tecidos da ATM e do gânglio trigeminal de ratos com artrite na ATM induzida por Zy

Primeiramente, pela análise da *melting curve*, não foi observada a presença de contaminantes nucleicos que pudessem interferir nos resultados na reação de qRT-PCR (**Figura 35**).

Observa-se aumento significativo ($p < 0,05$) da expressão gênica relativa (em relação ao controle endógeno GAPDH) de HO-1 na ATM de ratos a partir da 6^a h até a 24^a h após indução da artrite por Zy (2 mg/art.; 40 μ L), com um pico de expressão gênica relativa na 9^a h, quando comparado ao grupo sham (**Figura 36 A**). Em tecidos do gânglio trigeminal, observa-se aumento significativo ($p < 0,05$) da expressão gênica relativa (em relação ao controle endógeno GAPDH) de HO-1 na 12^a h após indução da artrite por Zy (2 mg/art.; 40 μ L), quando comparado ao grupo sham (**Figura 36 B**).

Há também aumento significativo ($p < 0,05$) da expressão gênica relativa (em relação ao controle endógeno GAPDH) de TNF α (**Figura 37 A**) ATM de ratos a partir da 3^a h até a 24^a h após indução da artrite por Zy (2 mg/art.; 40 μ L), com um

pico de expressão gênica relativa na 9^a h, quando comparado ao grupo sham. Em tecidos do gânglio trigeminal, observa-se aumento significativo ($p < 0,05$) da expressão gênica relativa (em relação ao controle endógeno GAPDH) na 6^a h e 12^a h após indução da artrite por Zy (2 mg/art.; 40 μ L), quando comparado ao grupo sham (**Figura 37 B**).

Quanto ao IL-1 β , observa-se aumento significativo ($p < 0,05$) da expressão gênica relativa (em relação ao controle endógeno GAPDH) na ATM de ratos a partir da 3^a h até a 24^a h após indução da artrite por Zy (2 mg/art.; 40 μ L), com um pico de expressão gênica relativa na 9^a h, quando comparado ao grupo sham (**Figura 38 A**). Em tecidos do gânglio trigeminal, observa-se aumento significativo ($p < 0,05$) da expressão gênica relativa (em relação ao controle endógeno GAPDH) de IL-1 β a partir da 6^a h após indução da artrite por Zy (2 mg/art.; 40 μ L), com um pico na 12^a h, quando comparado ao grupo sham (**Figura 38 B**).

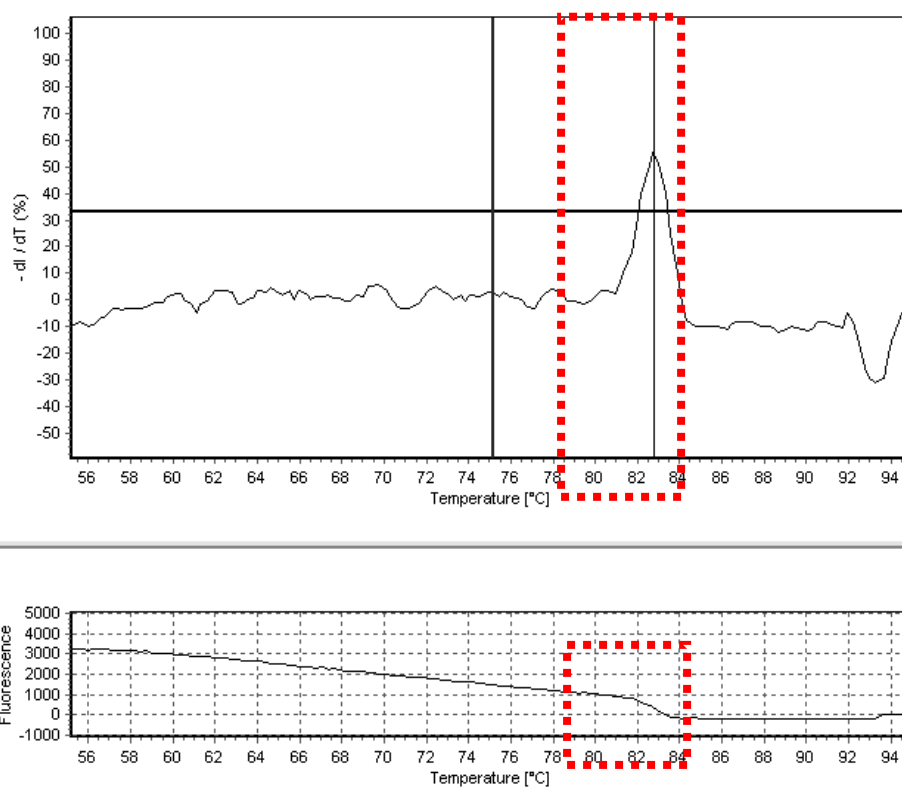
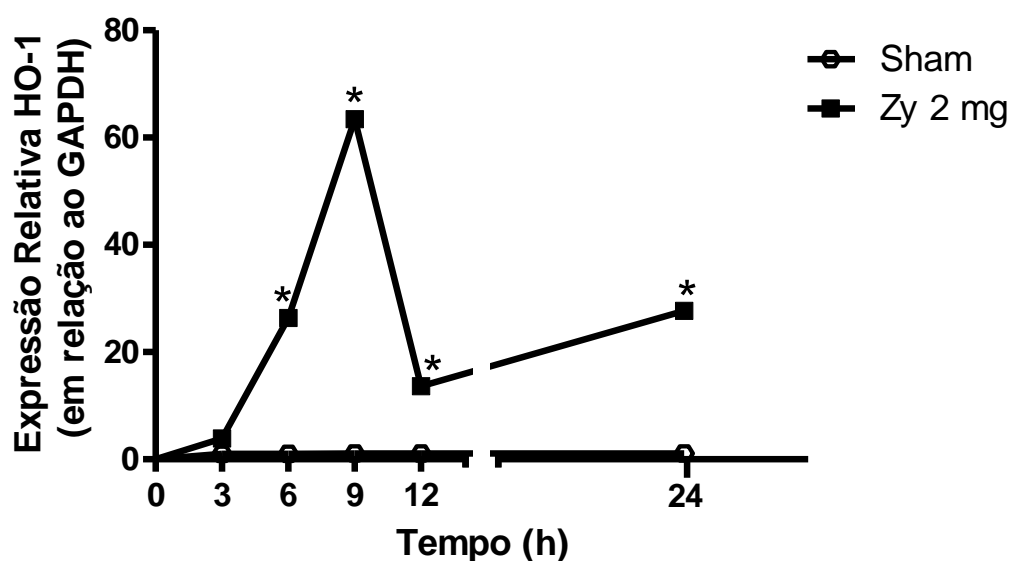
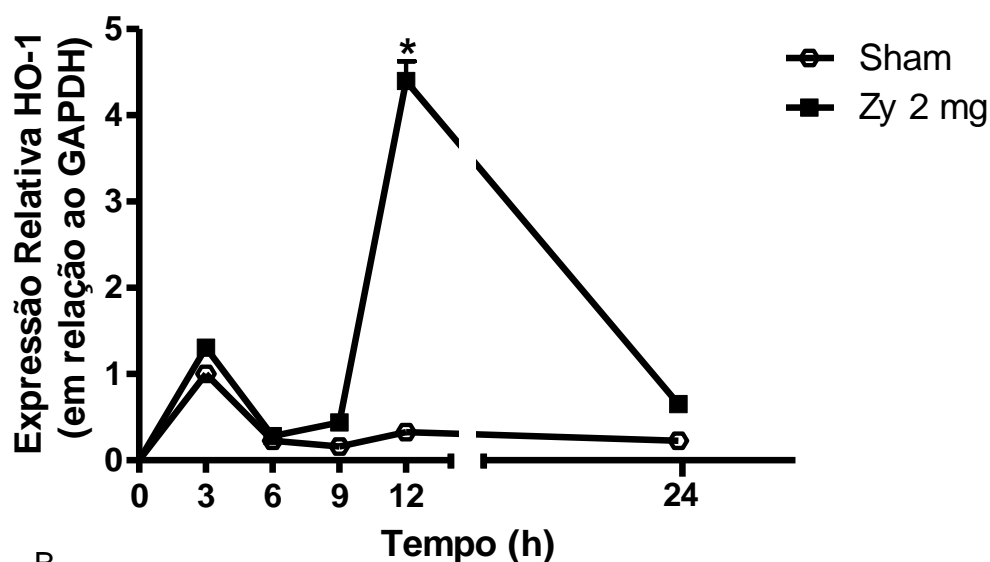


Figura 35. Análise da *Melting curve*. A análise consistiu da mensuração da fluorescência do SYBR® Green pela absorvância 520 nm durante gradiente de redução de temperatura para verificação da presença de contaminantes (DNA genômico e/ou interações inespecíficas ou indesejadas dos *primers*). A área marcada de vermelho indica a presença de um único tipo de *amplicon* com temperatura de desnaturação de 82, 89° C.

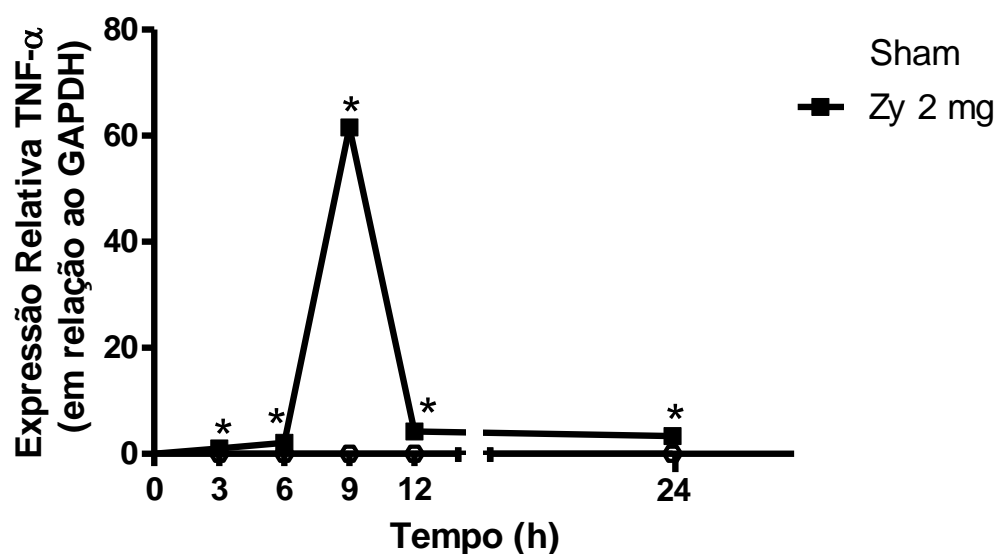


A

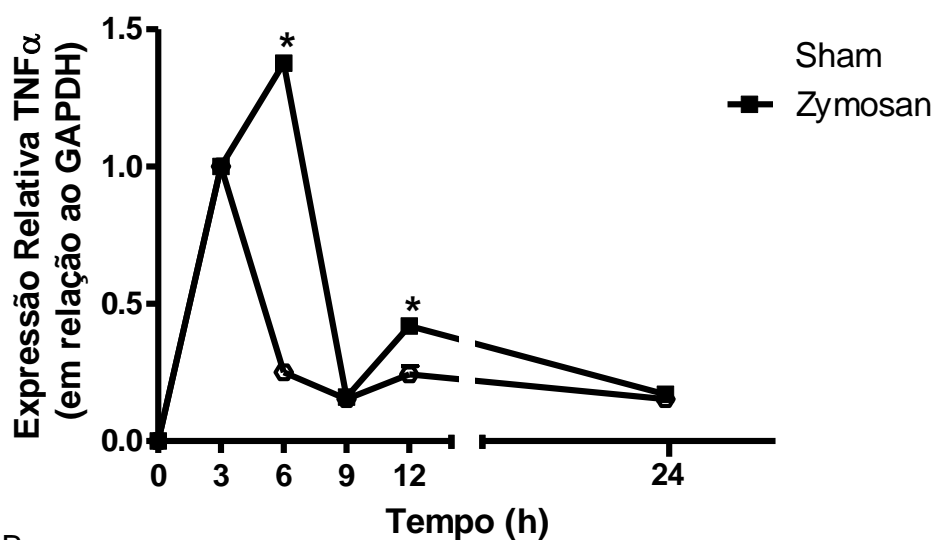


B

Figura 36. Curva-temporal da expressão gênica relativa do RNAm para HO-1 em tecidos articulares e no gânglio trigeminal de ratos com artrite na ATM induzida por zymosan. Zy (2 mg; 40 μ L) foi injetado na ATM esquerda de ratos. O grupo sham recebeu 40 μ L solução salina i.art. Os animais foram sacrificados nos tempos 3 h, 6 h, 9 h, 12 h e 24 h após indução da artrite, e os tecidos articulares da ATM (A) e do gânglio trigeminal (B) esquerdos removidos e armazenados para processamento da qRT-PCR. Há aumento da expressão gênica relativa de HO-1 a partir da 6^a h na ATM (A) e na 12^a h no gânglio trigeminal (B). Cálculo realizado através do método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$. * $p < 0,05$ em relação ao grupo sham (ANOVA, Bonferroni).

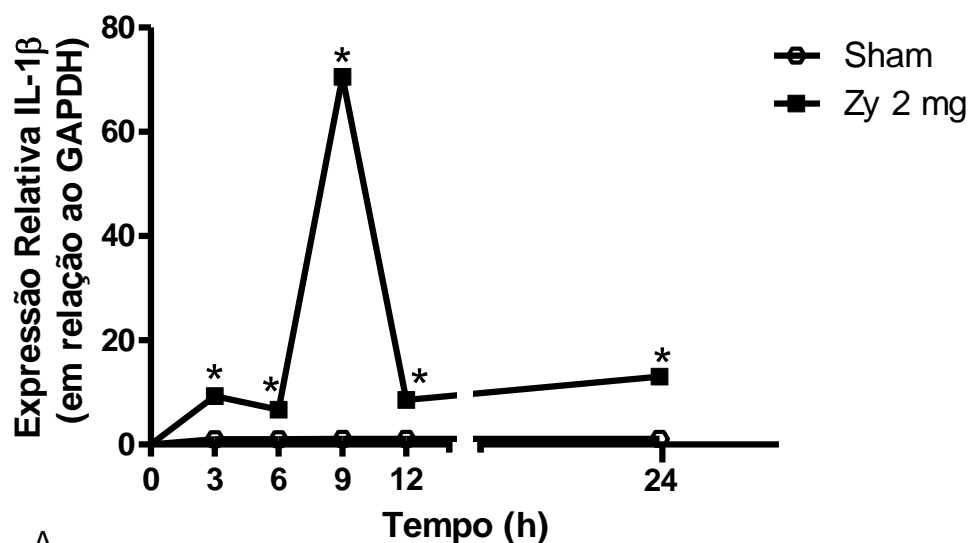


A

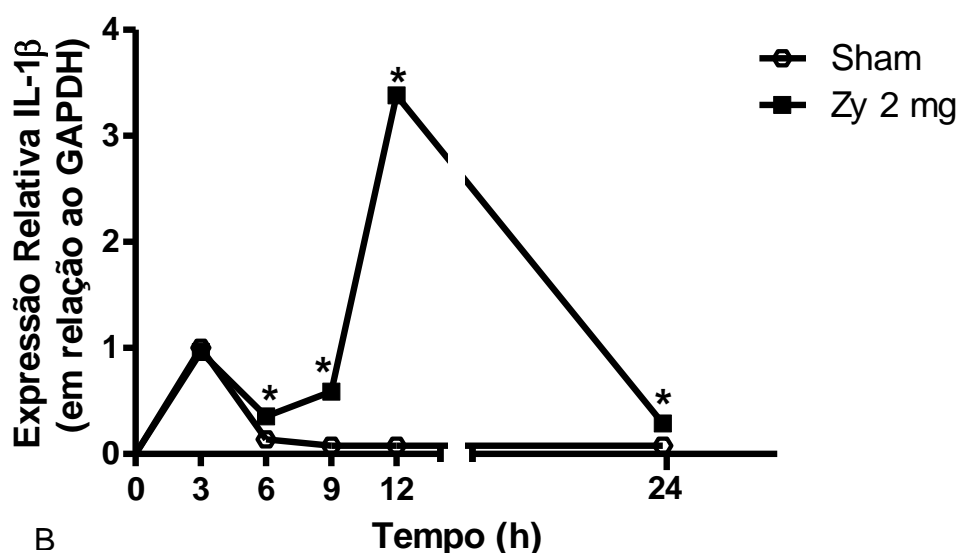


B

Figura 37. Curva-temporal da expressão gênica relativa do RNAm para TNF α em tecidos articulares e no gânglio trigeminal de ratos com artrite na ATM induzida por zymosan. Zy (2 mg; 40 μ L) foi injetado na ATM esquerda de ratos. O grupo sham recebeu 40 μ L solução salina i.art. Os animais foram sacrificados nos tempos 3 h, 6 h, 9 h, 12 h e 24 h após indução da artrite, e os tecidos articulares da ATM e do gânglio trigeminal esquerdos removidos e armazenados para processamento da qRT-PCR. Há aumento da expressão gênica relativa de TNF α a partir da 3^a h com pico na 9^a h na ATM (A) e na 6^a h e 12^a h no gânglio trigeminal (B). Cálculo realizado através do método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$. * $p < 0,05$ em relação ao grupo sham (ANOVA, Bonferroni).



A



B

Figura 38. Curva-temporal da expressão gênica relativa do RNAm para IL-1 β em tecidos articulares e no gânglio trigeminal de ratos com artrite na ATM induzida por zymosan. Zy (2 mg; 40 μ L) foi injetado na ATM esquerda de ratos. O grupo sham recebeu 40 μ L solução salina i.art. Os animais foram sacrificados nos tempos 3 h, 6 h, 9 h, 12 h e 24 h após indução da artrite, e os tecidos articulares da ATM e do gânglio trigeminal esquerdos removidos e armazenados para processamento da qRT-PCR. Há aumento da expressão gênica relativa de IL-1 β a partir da 3^ah com pico na 9^a h na ATM (A) e a partir da 6^a h, com pico na 12^a h, no gânglio trigeminal (B). Cálculo realizado através do método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$. * $p < 0,05$ em relação ao grupo sham (ANOVA, Bonferroni).

5.5. Estudo por imunohistoquímica da expressão de HO-1, TNF α e IL-1 β em tecidos articulares e no gânglio trigeminal de ratos com artrite na ATM induzida por Zy

Para comprovação de que a expressão gênica de HO-1, TNF α e IL-1 β resultou na síntese proteica desses mediadores inflamatórios e para identificar quais tipos celulares produzem HO-1, IL-1 β e TNF α , foi realizado estudo por imunohistoquímica na ATM, na 6^a h após indução da artrite, e no gânglio trigeminal, na 12^a h após indução da artrite, de ratos com artrite na ATM.

5.5.1. Estudo por imunohistoquímica da expressão de HO-1, TNF α e IL-1 β em tecidos articulares de ratos com artrite na ATM induzida por Zy

O estudo da expressão por imunohistoquímica para HO-1 mostrou aumento de expressão de HO-1 na ATM de animais com artrite (**Figura 39 C, D**) em relação aos animais sham (**Figura 39 B**), caracterizada pela coloração marrom nas células. Em animais com artrite na ATM observa-se que a marcação celular para a enzima HO-1 foi identificada em condrócitos (**Figura 39 C**), células sinoviais e neutrófilos (**Figura 39 D**). O controle negativo da reação de imunohistoquímica foi composto da ATM de ratos com artrite induzida por Zy e que não foram incubados com anticorpo primário (**Figura 39 A**).

Na reação da expressão por imunohistoquímica de TNF α , observa-se leve aumento de expressão de TNF α na ATM de animais com artrite (**Figura 40 C, D**) em relação aos animais sham (**Figura 40 A, B**). Em animais com artrite na ATM observa-se que a leve marcação celular para TNF α foi identificada em condrócitos (**Figura 40 C**), em células sinoviais e em neutrófilos (**Figura 40 D**).

Na reação da expressão por imunohistoquímica de IL-1 β , observa-se expressivo aumento de expressão de IL-1 β na ATM de animais com artrite (**Figura 41 B, C**) em relação aos animais sham (**Figura 41 A**). Em animais com artrite na ATM observa-se que a marcação celular para IL-1 β α foi identificada em condrócitos (**Figura 41 B**), em células sinoviais e em neutrófilos (**Figura 41 C**). Observa-se que a imunomarcacão para IL-1 β em neutrófilos ocorre de forma mais intensa do que para TNF α .

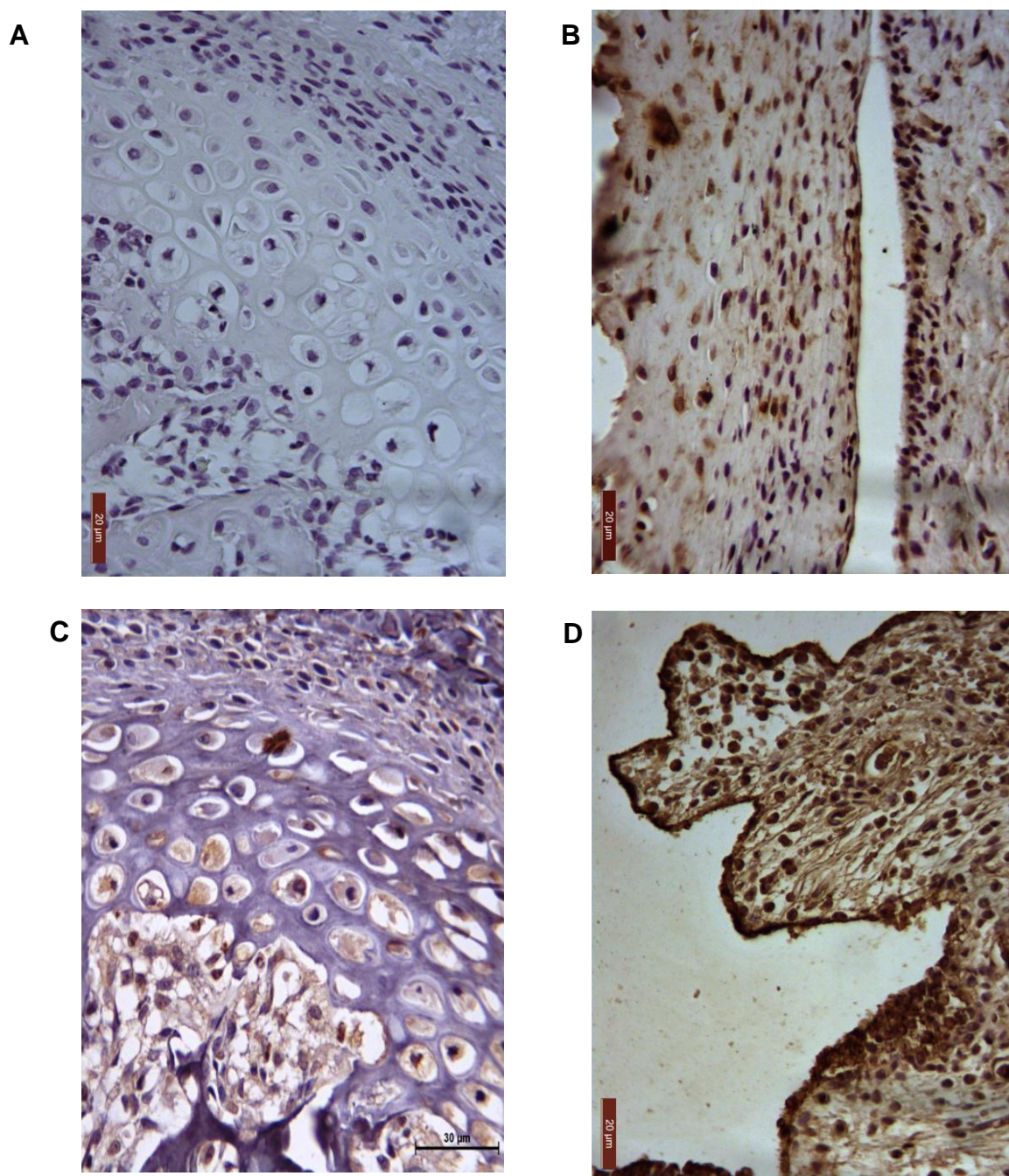


Figura 39. Fotomicrografias de imunomarcção para HO-1 na ATM de ratos com artrite na ATM induzida por zymosan. Zy (2 mg; 40 μ L) foi injetado na ATM esquerda de ratos. O grupo sham recebeu 40 μ L solução salina i.art. Os animais foram sacrificados na 6^a h após indução da artrite, e suas ATM esquerdas removidas para realização de cortes histológicos, processados para reação de imunohistoquímica. (A): controle negativo (cortes que não foram incubados com anticorpo primário) (400 x). (B): ATM de animais sham (400 x). (C, D): ATM de animais com artrite induzida por Zy mostrando notória imunomarcção para HO-1 em condrócitos (C), sinoviócitos e neutrófilos (D) (400 x).

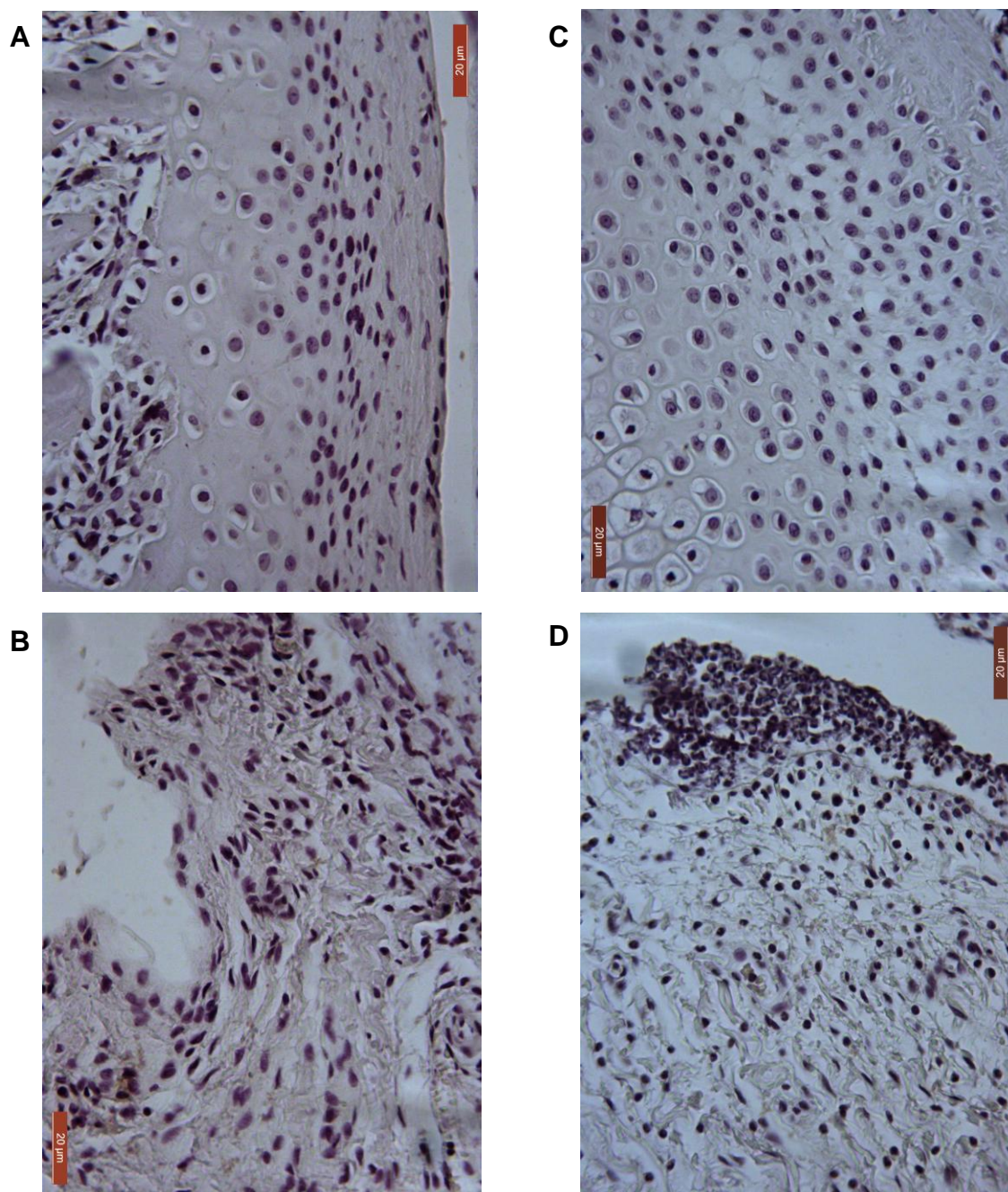


Figura 40. Fotomicrografias de imunomarcção para TNF α na ATM de ratos com artrite na ATM induzida por zymosan. Zy (2 mg; 40 μ L) foi injetado na ATM esquerda de ratos. O grupo sham recebeu 40 μ L solução salina i.art. Os animais foram sacrificados na 6^a h após indução da artrite, e suas ATM esquerdas removidas para realização de cortes histológicos, processados para reação de imunohistoquímica. (A, B): ATM de animais sham (400x). (C, D): ATM de animais com artrite induzida por Zy mostrando leve imunomarcção para TNF α em condrócitos (C), sinoviócitos e neutrófilos (D) (400 x).

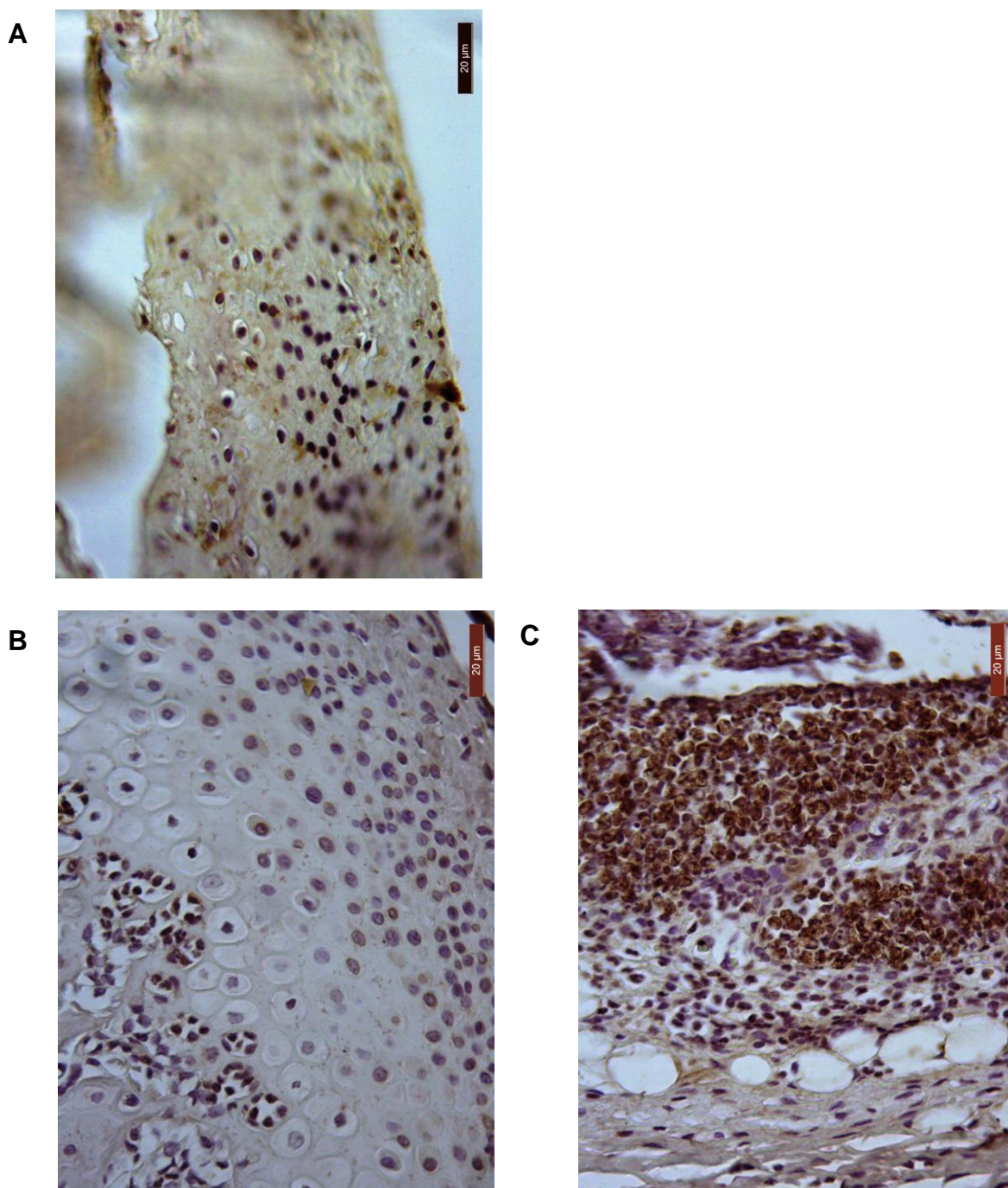


Figura 41. Fotomicrografias de imunomarcção para IL-1 β na ATM de ratos com artrite na ATM induzida por zymosan. Zy (2 mg; 40 μ L) foi injetado na ATM esquerda de ratos. O grupo sham recebeu 40 μ L soluçoo salina i.art. Os animais foram sacrificados na 6^a h após induçoo da artrite, e suas ATM esquerdas removidas para realizaçoo de cortes histológicos, processados para reaçoo de imunohistoquímica. (A): ATM de animais sham (400 x). (B, C): ATM de animais com artrite induzida por Zy mostrando notória imunomarcçoo para IL-1 β em condrócitos (B), sinoviócitos e neutrófilos (C) (400 x).

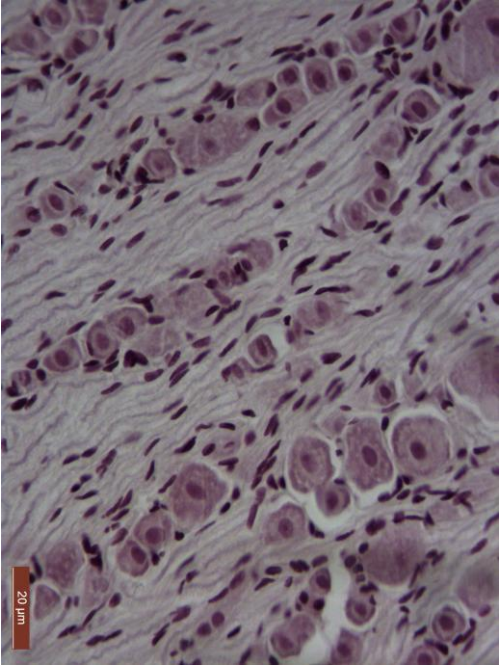
5.5.2. Estudo por imunohistoquímica da expressão de HO-1, TNF α e IL-1 β no gânglio trigeminal de ratos com artrite na ATM induzida por Zy

O estudo da reação da expressão por imunohistoquímica para HO-1 no gânglio trigeminal de ratos na 12^a h após indução da artrite por Zy mostrou aumento de expressão de HO-1 nos animais com artrite (**Figura 42 C**) em relação aos animais sham (**Figura 42 B**), caracterizada pela coloração marrom nas células. Em animais com artrite na ATM observa-se que a marcação celular para a enzima HO-1 foi identificada tanto no corpo celular do neurônio aferente primário quanto nas células satélites da glia que circundam o corpo celular neuronal de gânglio trigeminal (**Figura 42 C**). O controle negativo da reação de imunohistoquímica foi composto de gânglio trigeminal de ratos com artrite induzida por Zy e que não foram incubados com anticorpo primário (**Figura 42 A**).

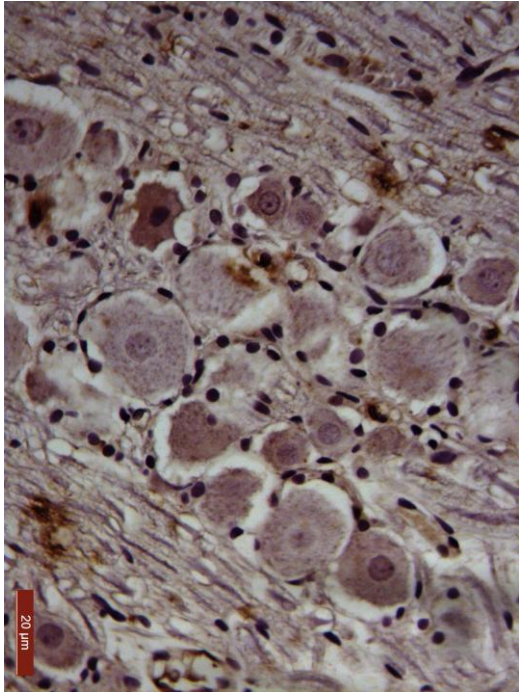
Na reação da expressão por imunohistoquímica de TNF α no gânglio trigeminal de ratos na 12^a h após indução da artrite por Zy, observa-se leve aumento de expressão de TNF α no gânglio trigeminal de animais com artrite na ATM (**Figura 43 B**) em relação aos animais sham (**Figura 43 A**), caracterizada pela coloração marrom nas células. Semelhante à expressão de HO-1, também em animais com artrite na ATM observa-se que a marcação celular para TNF α foi identificada no corpo celular do neurônio aferente primário e nas células satélites da glia (**Figura 43 B**).

Na reação da expressão por imunohistoquímica de IL-1 β no gânglio trigeminal de ratos na 12^a h após indução da artrite por Zy, observa-se expressivo aumento de expressão de IL-1 β no gânglio trigeminal de animais com artrite na ATM (**Figura 44 B**) em relação aos animais sham (**Figura 44 A**). Semelhante à expressão de HO-1 e de TNF α , também em animais com artrite na ATM observa-se que a marcação celular para IL-1 β foi identificada no corpo celular do neurônio aferente primário e nas células satélites da glia (**Figura 44 B**).

A



B



C

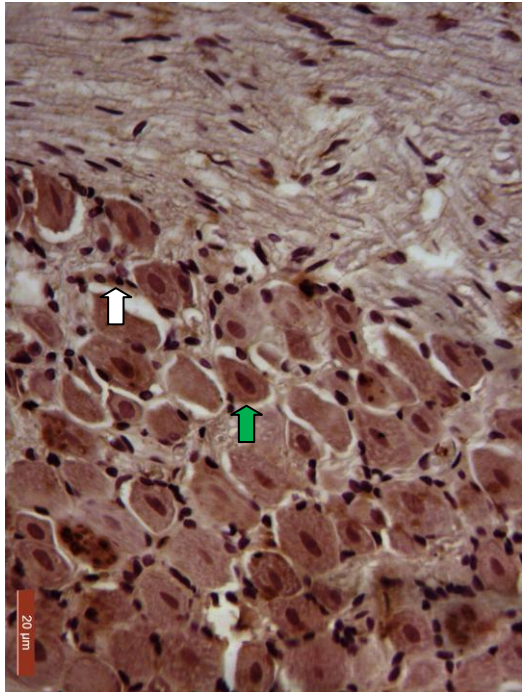


Figura 42. Fotomicrografias de imunomarcação para HO-1 no gânglio trigeminal de ratos com artrite na ATM induzida por zymosan. Zy (2 mg; 40 μ L) foi injetado na ATM esquerda de ratos. O grupo sham recebeu 40 μ L solução salina i.art. Os animais foram sacrificados na 12^a h após indução da artrite, e seus gânglios trigeminais esquerdos removidos para realização de cortes histológicos, processados para reação de imunohistoquímica. (A): controle negativo (cortes que não foram incubados com anticorpo primário) gânglios trigeminais de animais com artrite induzida por Zy não apresentando imunomarcação (400 x). (B): gânglio trigeminal de animais sham (400 x). (C): gânglio trigeminal de animais com artrite induzida por Zy mostrando notória imunomarcação para HO-1 no corpo celular do neurônio aferente primário e nas células satélites da glia (400 x). Seta verde: corpo celular neuronal; seta branca: células satélites da glia.

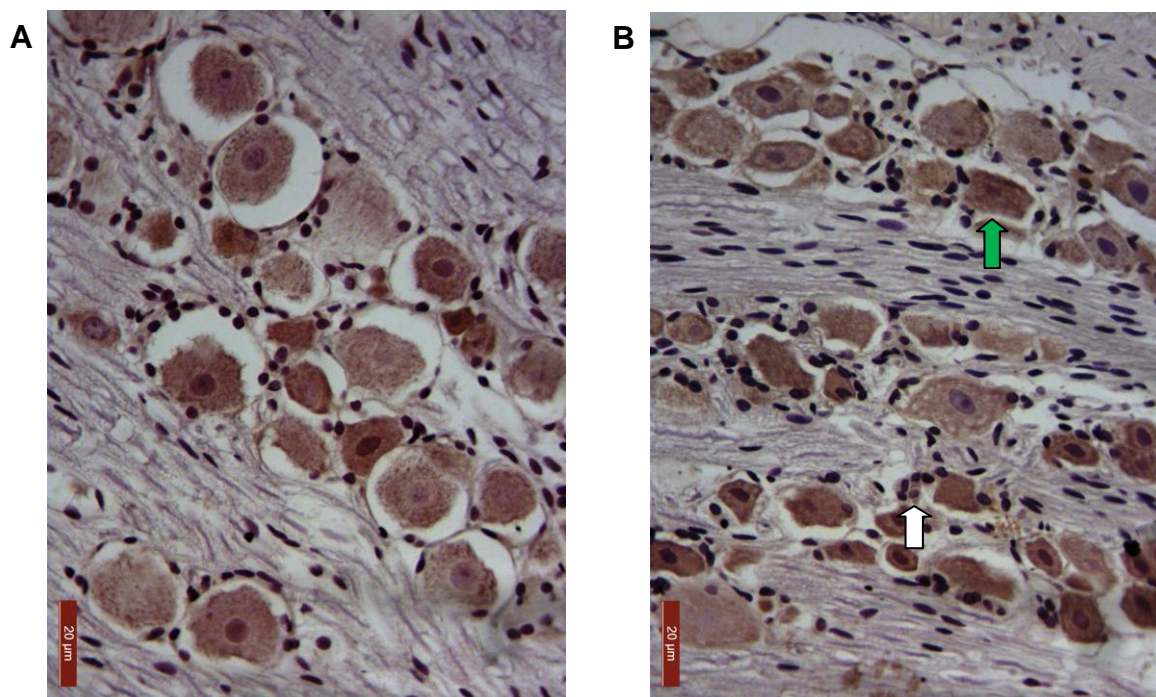


Figura 43. Fotomicrografias de imunomarcção para TNF α no gânglio trigeminal de ratos com artrite na ATM induzida por zymosan. Zy (2 mg; 40 μ L) foi injetado na ATM esquerda de ratos. O grupo sham recebeu 40 μ L solução salina i.art. Os animais foram sacrificados na 12^a h após indução da artrite, e seus gânglios trigeminais esquerdos removidos para realização de cortes histológicos, processados para reação de imunohistoquímica. (A): gânglio trigeminal de animais sham (400x). (B): gânglio trigeminal de animais com artrite induzida por Zy mostrando discreta imunomarcção para TNF α no corpo celular do neurônio aferente primário e nas células satélites da glia (400 x). Seta verde: corpo celular neuronal; seta branca: células satélites da glia.

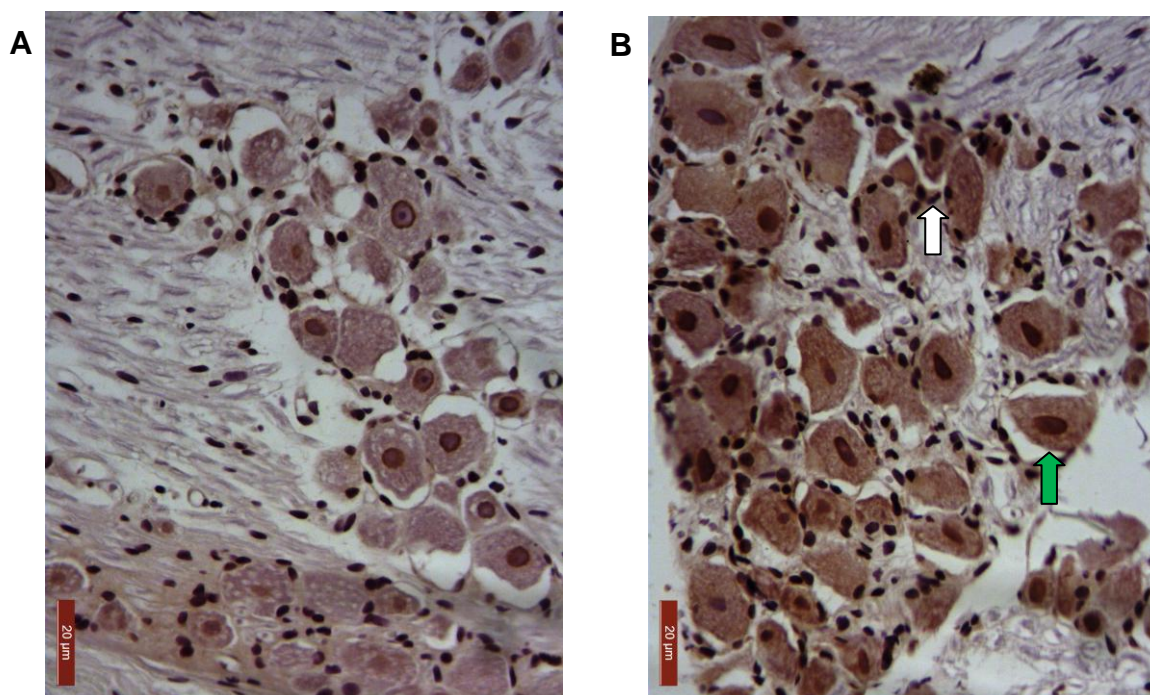


Figura 44. Fotomicrografias de imunomarcção para IL-1 β no gânglio trigeminal de ratos com artrite na ATM induzida por zymosan. Zy (2 mg; 40 μ L) foi injetado na ATM esquerda de ratos. O grupo sham recebeu 40 μ L solução salina i.art. Os animais foram sacrificados na 12^a h após indução da artrite, e seus gânglios trigeminais esquerdos removidos para realização de cortes histológicos, processados para reação de imunohistoquímica. (A): gânglio trigeminal de animais sham (400x). (B): gânglio trigeminal de animais com artrite induzida por Zy mostrando notória imunomarcção para IL-1 β no corpo celular do neurônio aferente primário e nas células satélites da glia (400 x). Seta verde: corpo celular neuronal; seta branca: células satélites da glia.

5.6. Estudo dos níveis séricos de bilirrubina em ratos com artrite na ATM induzida por Zy

Para comprovação de que a proteína HO-1 exerceu sua atividade enzimática após a síntese proteica de HO-1, resultado da expressão gênica de HO-1, foi realizada a determinação da concentração sérica de bilirrubina nos animais com artrite na ATM induzida por Zy 2 mg na 9ª h após indução da artrite.

Observou-se que em animais com artrite na ATM foi encontrado o nível sérico significativamente ($p < 0,05$) elevado de bilirrubina quando comparado ao grupo sham (**Tabela 6**).

Tabela 6. Níveis séricos de bilirubina (mg/ml) em animais com artrite na ATM induzida por Zy e do grupos sham.

	Sham	Zy 2 mg
Bilirrubina	0,077±0,51	17,12±5,94 *

* $p < 0,05$ em relação ao grupo sham (Teste t).

5.7. Dosagem de IL-1 β no lavado sinovial de ratos com artrite na ATM induzida por Zy

Para comprovação de que a citocina IL-1 β foi produzida pelos condrócitos, sinoviócitos e neutrófilos, realizou-se dosagem da citocina no lavado sinovial na 6ª h após artrite na ATM induzida por Zy 2 mg.

Observou-se que em animais com artrite na ATM foi encontrado o nível significativamente ($p < 0,05$) elevado de IL-1 β no lavado sinovial quando comparado ao grupo sham (**Figura 45**).

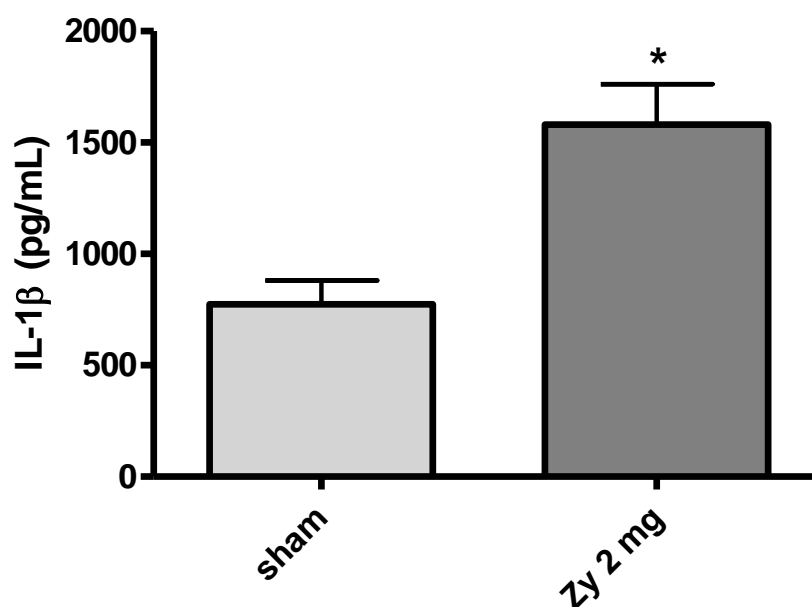


Figura 45. Dosagem de IL-1 β no lavado sinovial de ratos com artrite na ATM induzida por zymosan. Zy (2 mg; 40 μ L) foi injetado na ATM esquerda de ratos. O grupo sham recebeu 40 μ L solução salina i.art. O lavado sinovial foi coletado na 6^a h após a indução da artrite na ATM por Zy. Os dados representam a média \pm epm (n=6). * $p < 0,05$ em relação ao grupo sham (Teste t).

6. DISCUSSÃO

Neste trabalho, propomo-nos, inicialmente, padronizar um modelo experimental que estude a nocicepção articular e as alterações inflamatórias na articulação temporomandibular. Desenvolvemos então, pela primeira vez na literatura, um modelo de hipernocicepção articular e de artrite na ATM induzida por zymosan. Investigamos, neste modelo experimental, a hipernocicepção articular, o extravasamento plasmático, a migração celular, a participação de neutrófilos e as alterações histopatológicas tanto na fase aguda quanto na fase crônica da artrite na ATM e no gânglio trigeminal. Avaliamos também, pela primeira vez na literatura, a participação da via hemeoxigenase-1/biliverdina/monóxido de carbono na hipernocicepção articular e na artrite da ATM, através indutores e inibidores da via, e o mecanismo de ação através do estudo do envolvimento de GMPc e canais de K⁺ sensíveis a ATP. Ademais, realizamos estudo em biologia molecular para identificar expressão gênica da HO-1, assim como dos mediadores inflamatórios TNF α e IL-1 β na ATM e no gânglio trigeminal; identificamos as células responsáveis pela produção desses mediadores inflamatórios, e ratificamos a atividade enzimática de HO-1 pela dosagem de bilirrubina, assim como a produção das citocinas através de suas dosagens no lavado sinovial.

Sabe-se que a articulação temporomandibular de ratos apresenta semelhanças com a articulação de humanos, comprovada através de análises histopatológica, histoquímica e imunohistoquímica, podendo, portanto, ser utilizada em estudos experimentais (FURSTMAN, 1964; FUJITA; HOSHINO, 1989; NOZAWA-INOUE *et al.*, 2003).

Têm sido descritos na literatura alguns modelos experimentais para estudo da artrite na ATM e da nocicepção articular através de procedimentos cirúrgicos (YAILLEN *et al.*, 1979; HELMY *et al.*, 1988; SHIMODA *et al.*, 1989; ISHIMARU; GOSS, 1992; LEKKAS, 1994; MONJE *et al.*, 1993; TOMINAGA *et al.*, 2002), de procedimentos mecânicos (ALI; SHARAWY, 1994; IMAI *et al.*, 2001), assim como através do uso de animais modificados geneticamente (EMBREE *et al.*, 2011), pela administração de substâncias administradas sistemicamente (ZAMMA, 1983; AL-MOBIREEK *et al.*, 2000) e, principalmente, pela administração de substâncias localmente na ATM de ratos (YU *et al.*, 1995; NOGUCHI *et al.*, 2005; REN, 1999; HAAS *et al.*, 1992; CARLESON *et al.*, 1996; LUNDEBERG *et al.*, 1996;

FIorentino *et al.*, 1999; Cairns *et al.*, 1998; 2001; Broton & Sessle, 1988; Tomimaga *et al.*, 1999; Kawai *et al.*, em 2000; Roveroni *et al.*, 2001; Kerins *et al.*, 2003; 2005; Takeuchi *et al.*, 2004; Lam *et al.*, 2005; Denadai-Sousa *et al.*, 2009).

O zymosan tem sido usado como um agente pró-inflamatório já há alguns anos (Gado; Gigger, 1991). Para nosso conhecimento, esse é o primeiro trabalho demonstrando o modelo experimental de hipernocicepção articular e de artrite na ATM induzida por Zy. A artrite aguda induzida por Zy, inicialmente proposta em joelho de ratos (Rocha *et al.*, 1999), é caracterizada pelo aumento da permeabilidade vascular, migração celular e dor. Posteriormente se caracteriza por uma progressiva sinovite com células mononucleares, ativação de fibroblastos e formação do *pannus* (Keystone *et al.*, 1977; Gégout *et al.*, 1994). Há ainda estudos sugerindo degradação da cartilagem articular e do osso subcondral na fase crônica da artrite por zymozan (Gégout *et al.*, 1995; Bezerra *et al.*, 2004).

Nossos resultados mostraram que a administração de Zy 2 mg na ATM, mas não de salina, induziu hipernocicepção articular, aumento do extravasamento plasmático, influxo leucocitário e aumento da atividade de MPO, semelhante ao observado na articulação de joelhos (Rocha *et al.*, 1999; Bezerra *et al.*, 2004). Em modelo de neurite inflamatória no nervo ciático, tanto doses baixas quanto altas de zymosan causaram hipernocicepção. Apenas maiores doses de zymosan, entretanto, estavam associadas ao aumento da liberação de IL-1 β , TNF α e espécies reativas de oxigênio a partir de células imunes periciáticas (Gazda *et al.*, 2001). Esses dados sugerem que baixas doses de zymosan na ATM causaram hipernocicepção, embora não estivessem associadas à condição inflamatória através da estimulação celular. No presente trabalho, zymosan na dose de 2 mg foi escolhido, ao invés de 0,25, 0,5 ou 1 mg, por ser a melhor dose para estimular tanto comportamento nociceptivo quanto parâmetros inflamatórios.

De fato, uma dose única de zymosan 2 mg na ATM dos animais resultou em grande aumento da permeabilidade vascular, com início na 4^a h após injeção de Zy, com pico na 6^a h, apresentando uma segunda fase de extravasamento de azul de Evans observada na 24^a h. Essa primeira fase de resposta vascular ocorre em paralelo à redução do limiar resposta nociceptiva facial, um sinal clássico na artrite da ATM em humanos, em paralelo ao aumento da contagem total do número de leucócitos e da atividade de MPO (enzima presente nos grânulos azurófilos de

neutrófilos) tanto em tecidos articulares quanto do lavado sinovial, mostrando a infiltração neutrofílica para o sítio inflamatório da ATM. Como a atividade de MPO foi semelhante quando dosada nos tecidos articulares e no lavado sinovial, passamos a avaliar a atividade da enzima no lavado sinovial. Haas *et al.* (1992), em modelo de artrite na ATM induzida por óleo de mostarda, já haviam mostrado a presença de neutrófilos na inflamação aguda da ATM e extravasamento de azul de Evans com 30 min da artrite, similar ao encontrado por Fiorentino *et al.* (1999), este utilizando óleo de mostarda ou glutamato para induzir a artrite. Em outro modelo experimental, de artrite na ATM induzida por carragenina, Denadai-Souza *et al.* (2009) também observaram influxo leucocitário, atividade de MPO e extravasamento plasmático apresentando uma cinética mais semelhante à artrite induzida por zymosan. Foi documentada também a presença de MPO no lavado sinovial de pacientes com artrite reumatóide e de pacientes com desarranjos internos articulares na ATM (EDWARDS *et al.*, 1988; ARINCI *et al.*, 2005).

A segunda fase de extravasamento plasmático na 24^a h, também observado em modelo de artrite na ATM induzida por carragenina (DENADAI-SOUZA *et al.*, 2009), provavelmente está relacionada à infiltração de células mononucleares, como pode ser ratificado pela análise histopatológica em nosso trabalho. Estudos anteriores, na artrite induzida por Zy em joelhos (ROCHA *et al.*, 1999; BEZERRA *et al.*, 2004) e na artrite da ATM induzida por carragenina (GOULART *et al.*, 2005; DENADAI-SOUZA *et al.*, 2009), mostraram infiltrado inflamatório agudo nos tecidos articulares, sendo substituído pelo processo inflamatório crônico caracterizado pela infiltração de mononucleares. Essa segunda fase de extravasamento de azul de Evans ocorreu juntamente à presença de hipernocicepção articular, porém não foi acompanhada de infiltração leucocitária nem da atividade de MPO. Provavelmente esse evento pode estar relacionado a alguma disfunção da barreira endotelial como uma consequência do dano tecidual, como sugerido por VAUDO *et al.* (2004).

Todo esse processo inflamatório gerado causa sensibilização periférica dos nociceptores levando à hipernocicepção articular. Takeuchi *et al.* (2004), em estudo *in vitro* de preparação do nervo auriculotemporal, sugeriu que a inflamação pode sensibilizar os nociceptores da ATM levando à sensação exacerbada de dor (hiperalgesia) e à sensação de dor oriunda de estímulos não dolorosos (alodinia). Sabe-se que as condições dolorosas associadas às DTMs são geralmente

associadas à dor primária e efeitos subsequentes como hiperalgesia secundária, alodinia e dor referida, sugerindo o envolvimento de mecanismo neurais tanto periféricos quanto centrais (SESSLE *et al.*, 1986; SESSLE; HU, 1991; SESSLE, 1999; 2000; 2005a; 2005b). Nós estudamos a resposta mecânica à nocicepção gerada pelo zymosan na ATM de ratos utilizando um analgesímetro digital, previamente testado e validado, baseado nos mesmos princípios dos filamentos de von Frey, já utilizado anteriormente na ATM de ratos, superando-os em relação à precisão na medida do limiar de nocicepção (REN, 1999; PARADA *et al.*, 2003; DENADAI-SOUZA *et al.*, 2009). Neste sentido, a hipernocicepção analisada no presente estudo corresponde a uma dor articular real, embora seja aferida na pele do animal. A saber, a dor articular exacerbada pela palpação na ATM através da pele é um dos critérios para diagnóstico diferencial recomendado pelo Guidelines da Academia Americana de Dor Orofacial, publicado na última classificação das dores orofaciais (DE LEEW, 2008). Ademais, uma característica da maioria dos neurônios que recebem aferência nociceptiva de estruturas profundas é sua resposta também a aferências cutâneas, o que sugere o envolvimento desses neurônios não apenas na detecção da dor articular aguda, mas também na hiperalgesia e na pobre localização da dor que caracteriza muitas condições dolorosas das articulações e outras estruturas profundas (SESSLE *et al.*, 1986; SESSLE; HU, 1991; SESSLE, 1999; 2000; 2005a; 2005b).

A hipernocicepção articular avaliada, portanto, foi acompanhada de influxo neutrofílico, ratificado pelo aumento da atividade de MPO, semelhante ao observado na artrite induzida por Zy em joelhos, em que a atividade de MPO se mostrou elevada, ressaltando a importância dos neutrófilos para a hiperalgesia (BEZERRA *et al.*, 2007). O limiar de retirada da cabeça do animal iniciou na 2ª h após a injeção de Zy na ATM, apresentando pico entre a 3ª e 4ª h, iniciando sua redução a partir da 9ª h, mantendo-se até a 24ª h. Na artrite induzida por zymosan em joelhos, observou-se padrão semelhante de resposta nociceptiva (ROCHA *et al.*, 1999). Na artrite induzida por adjuvante de Freund, entretanto, a nocicepção articular foi observada durante duas semanas (REN, 1999). Quando administrada formalina, a resposta comportamental foi avaliada por 45 min (ROVERONI *et al.*, 2001), e na artrite por carragenina, observou-se resposta nociceptiva por sete dias (DENADAI-SOUZA *et al.*, 2009). Considerando que a hipernocicepção articular foi máxima entre a 3ª e 4ª h da artrite, e o influxo celular foi máximo na 6ª h, foi sugerido utilizar esses

tempos no estudo da fisiopatologia da dor e da inflamação na ATM no presente estudo.

Em relação aos parâmetros inflamatórios, as características histológicas se correlacionam ao extravasamento plasmático, ao influxo leucocitário e à alta atividade de MPO, sendo visto na inflamação aguda da membrana sinovial, nos tecidos periarticulares e nos tecidos musculares estriados. Nosso trabalho é o primeiro a relacionar parâmetros inflamatórios histopatológicos agudos e crônicos envolvendo as estruturas articulares e periarticulares, ressaltando que outros estudos mostraram histopatologia da ATM sem, entretanto, atribuir escores para análise estatística de todas essas estruturas (ZAMMA, 1983; HAAS *et al.*, 1992; FUJITA; HOSHINO, 1989; GOULART *et al.*, 2005).

O presente trabalho mostrou que a injeção de Zy 2 mg na ATM de ratos foi capaz de induzir reação inflamatória nos tecidos articulares e periarticulares na fase aguda da artrite, quando se observou infiltrado celular na membrana sinovial (MS), no tecido conjuntivo periarticular e no tecido muscular estriado, sendo caracterizado predominantemente por células polimorfonucleares, com espessamento da MS. Corroborando com os achados de aumento da permeabilidade vascular através do aumento do extravasamento de azul de Evans, observamos também na histopatologia a presença de edema na MS. Em concordância com nossos achados, Haas *et al.* (1992) havia mostrado a presença de neutrófilos na fase aguda da inflamação na ATM induzida por óleo de mostarda. Goulart *et al.* (2005), entretanto, mostraram que hiperplasia da membrana sinovial na artrite da ATM induzida por carragenina e por fomalina só foi observada após 3 dias de indução da artrite, evidenciando curso diferente na progressão da doença dependente do estímulo inflamatório aplicado.

Na fase crônica da artrite na ATM induzida por Zy, observamos aumento de hiperplasia sinovial e perpetuação dos parâmetros de infiltração celular, com predominância de mononucleares. No 20º dia após indução da artrite, entretanto, o infiltrado celular no tecido conjuntivo periarticular e no tecido muscular esquelético foi reduzido. Neste momento observou-se fibrose acentuada dos tecidos articulares e periarticulares, mostrando a tentativa dos tecidos em realizar sua reestruturação, porém de maneira desorganizada, causando perpetuação do processo inflamatório com formação de fibrose e posterior perda da função e degradação das estruturas articulares. Zamma (1983) mostrou a presença de degeneração da cartilagem

articular e do osso subcondral na artrite da ATM, induzida pela inoculação intradérmica de adjuvante de Freund na escápula parietal de ratos, assim como formação de aderências na 5ª semana após indução da artrite. Segundo Yamaza *et al.* (2003), hiperplasia sinovial já seria um indício de doença degenerativa na ATM.

Goulart *et al.* (2005) observaram os achados histopatológicos até o 15º dia após indução da artrite por carragenina e por fomalina, mostrando que apenas injeção i.art. de formalina foi capaz de manter hiperplasia sinovial durante os 15 dias. Em nosso trabalho, entretanto, pudemos observar que, iniciando na fase aguda e perpetuando na fase crônica da artrite na ATM induzida por Zy, avaliado nos 10º, 20º e 30º dias, houve progressiva hiperplasia da membrana sinovial, com características de substituição da mesma por um tecido semelhante ao pannus reumatóide presente em pacientes com artrite reumatóide e na artrite por Zy em joelhos de ratos, o qual se caracteriza por apresentar intenso infiltrado mononuclear, hiperplasia da sinóvia, neoformação vascular, proliferação de fibroblastos e fibrose, já vistos a partir do 10º dia após indução da artrite, apresentando aumento no 20º e 30º dias. Nozawa-Inoue *et al.* (1998) também observaram aumento da vascularização da sinóvia após 21 dias de indução da artrite na ATM por inoculação intradérmica de adjuvante de Freund na escápula parietal de ratos. Helmy *et al.* (1989) mostraram existir células nos tecidos sinoviais de humanos que são potencialmente angiogênicas, justificando, possivelmente, a formação de novos vasos na sinóvia na fase crônica da artrite. Esses achados, em comparação aos achados na literatura, mostram que esse modelo experimental de artrite na ATM induzida por Zy é confiável, pois apresenta as fases aguda e crônica semelhantes ao que encontramos em humanos, podendo ser reproduzido e utilizado para estudar a fisiopatologia das alterações inflamatórias e degenerativas.

Já tem-se descrito na literatura a participação vários mediadores inflamatórios na artrite na ATM. Citocinas como interleucina-1 beta (IL-1 β), fator de necrose tumoral alfa (TNF α), interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8), e outros mediadores como serotonina (5-HT), neuropeptídeos, prostaglandinas (PGs) como PGE₂, leucotrienos (LTs), imunoglobulinas e ATP atuando em receptores P2X3 e P2X2/3 já foram descritos como importantes no desencadeamento desse processo (ALSTERGREN *et al.*, 1995; QUINN *et al.*, 2000; YAMAZA *et al.*, 2003; KANEYAMA *et al.*, 2002; 2005a; 2005b; FREDRIKSSON *et al.*, 2005; CHANG; ISRAEL, 2005; RODRIGUES *et al.*, 2006; KYRKANIDES *et al.*, 2007; TEIXEIRA *et al.* 2010a, 2010b;

VERNAL *et al.*, 2008). A prostaglandina PGJ_2 , assim como óxido nítrico (NO) e os receptores opióides μ e κ atuam na inibição da dor inflamatória na ATM (CHICRE-ALCÂNTARA *et al.*, 2012; QUINTEIRO *et al.*, 2012). Clinicamente, antiinflamatórios não-esteroidais (DAINES) são os fármacos de escolha no tratamento da artrite devido à sua capacidade de melhorar os sinais e sintomas como dor e edema (SIQUEIRA, TEIXEIRA, 2012). Experimentalmente, DAINES têm reduzido artrite na ATM induzida por carragenina (DENADAI-SOUZA *et al.*, 2009). Em nosso estudo, indometacina reduziu hipernocicepção articular, assim como os parâmetros inflamatórios de infiltração leucocitária e atividade de MPO. De fato, em estudo prévio do nosso grupo, foi mostrado que DAINES seletivos COX-2, como etoricoxibe, precisam da integridade da via da hemeoxigenase-1 para exercerem sua ação analgésica e anti-inflamatória (GRANGEIRO *et al.*, 2011).

Apesar de ter sido descoberta há mais de 40 anos (TENHUNEN *et al.*, 1969), o enfoque da via da HO-1/BVD/CO na dor e na inflamação tem sido dado nos últimos 20 anos. De fato, HO-1, seu substrato heme e seus produtos, CO, BVD e ferritina, obtida a partir do ferro, são capazes de modular o processo inflamatório (OTTERBEIN *et al.*, 2000; PAE *et al.*, 2004; ALCARAZ *et al.*, 2003; GRANGEIRO *et al.*, 2011). Para nosso conhecimento, esse trabalho também é o primeiro a estudar a participação da via HO-1/BVD/CO na dor facial e na artrite da ATM.

Observamos que o estímulo à via da HO-1/BVD/CO realmente exerce um importante efeito antinociceptivo e anti-inflamatório sobre a hipernocicepção articular e a artrite na ATM induzida por Zy. Constatamos que hemina, um substrato análogo utilizado como indutor da HO-1; DMDC, doador de CO (produto final da via enzimática de HO-1/BVD/CO); e biliverdina, produto final da via enzimática de HO-1/BVD/CO, foram capazes de reduzir hipernocicepção facial, influxo leucocitário e atividade de MPO, assim como todos os parâmetros histológicos. Ademais, o ZnPP IX, inibidor seletivo da enzima HO-1, causou um aumento de todos os parâmetros, reduzindo limiar de hipernocicepção facial e aumentando influxo leucocitário e atividade de MPO.

Em modelo de inflamação induzida por zymosan, a administração de hemina aumentou a expressão e a atividade de HO-1 associada ao aumento da produção de bilirrubina e apresentou ação anti-inflamatória observada pela redução de migração leucocitária, exsudação de líquido e redução da liberação de mediadores inflamatórios (VICENTE *et al.*, 2003). Sabe-se que a indução de HO-1

proporciona maior resistência das células endoteliais ao estresse oxidativo e inibe a expressão de moléculas de adesão, resultando em redução do influxo leucocitário (HAYASHI *et al.*, 1999). Nesse contexto, o controle da resposta inflamatória exercida pela HO-1 pode estar relacionada à inibição da expressão das moléculas de adesão P- e E- selectinas no endotélio vascular mediado por moléculas antioxidantes como biliverdina e bilirrubina (VACHHARAJANI *et al.*, 2000). Em estudo realizado por microscopia intravital, observou-se realmente que biliverdina reduziu rolamento, adesão e migração neutrofílica em modelo de inflamação induzida por carragenina (FREITAS *et al.*, 2006).

Em nosso modelo experimental, observamos que a dosagem de bilirrubina encontrou-se aumentada na 9^a h após indução da artrite por Zy, exatamente quando inicia o processo de redução do influxo leucocitário. Isso sugere que o modelo de artrite na ATM induzida por Zy é capaz de desencadear efeitos sistêmicos, visto que a dosagem de bilirrubina foi realizada sericamente. Ademais, em nosso estudo, ambos hemina, indutor de HO-1, e biliverdina, produto final da via, reduziram o desenvolvimento da artrite e da hipernocicepção articular. Baseado nesses resultados, podemos propor que a ação de HO-1 na artrite da ATM induzida por Zy, pelo menos em parte, é mediada pela inibição do recrutamento de neutrófilos, visto que a redução do influxo de neutrófilos foi observada pela redução da contagem total de leucócitos e pela atividade de MPO no lavado sinovial da ATM, e que isso pode ser mediado também pelo seu produto final biliverdina e bilirrubina. As características histológicas observadas corroboram com esses achados, evidenciando também redução da inflamação aguda na membrana sinovial, no tecido periarticular e no tecido muscular estriado, caracterizada principalmente pela redução da infiltração neutrofílica nos tecidos articulares e periarticulares. Esses dados sugerem que a indução de HO-1 pode apresentar um potencial terapêutico na fase aguda da artrite na ATM em humanos.

Nossos achados estão também em acordo com Bellanoua *et al.* (2008) que estudaram modelo experimental de artrite não autoimune, e observaram que o aumento de HO-1 causou resposta protetora na inflamação articular. Em modelos de artrite autoimune induzida por colágeno e adjuvante de Freund em camundongos, entretanto, observou-se um efeito dual de HO-1. A indução de HO-1 resultou em inibição de erosão na cartilagem e redução da fibrose articular, embora a inibição de HO-1 também tenha reduzido a inflamação articular e destruição da cartilagem

(DEVESA *et al.*, 2005a; 2005b). Esse mesmo grupo de pesquisa, porém, mostrou, em artrite induzida por colágeno, que tanto inibidores da HO-1 quanto compostos capazes de liberar CO promovem redução do infiltrado celular inflamatório, da inflamação articular e da destruição articular, assim como redução dos níveis de IL-1 β , IL-2, IL-6, TNF α e PGE2, mostrando a importância de compostos que liberam CO no tratamento da artrite (FERRÁNDIZ *et al.*, 2008; IBÁÑEZ *et al.*, 2011). Confirmando esses dados, também em artrite induzida por colágeno, foi demonstrado que tanto biliverdina quanto CO reduziram a condição inflamatória e a destruição óssea (BONELLI *et al.*, 2012). O envolvimento de HO-1 em condições crônicas de artrite na ATM, portanto, precisa ainda ser investigado. Sabe-se apenas que, durante inflamação crônica, HO-1 pode exercer uma ação anti-inflamatória inibindo infiltração leucocitária assim como facilitando o reparo tecidual através da estimulação do fator de crescimento vascular derivado do endotélio (VEGF) (BUSSOLATI *et al.*, 2004).

Sabe-se que os efeitos antinociceptivos e anti-inflamatórios da HO-1 dependem das propriedades bioquímicas dos produtos gerados a partir da degradação do heme, como monóxido de carbono, ferritina e biliverdina/bilirrubina (OTTERBEIN *et al.*, 2000). Kobayashi *et al.* (2006) afirmaram que o monóxido de carbono, mas não ferritina ou bilirrubina, era o principal responsável pelos efeitos inibitórios da expressão endógena ou da ação química a partir de HO-1 na síntese de mediadores inflamatórios. Outros autores concordam com essa ideia, reservando à bilirrubina e à ferritina exercerem suas funções via ação antioxidante (FERRÁNDIZ *et al.*, 2008; IBÁÑEZ *et al.*, 2011, BONELLI *et al.*, 2012).

Nosso estudo demonstrou que a hipernocicepção articular e a inflamação articular foram reduzidas a um padrão de resposta semelhante aos animais que receberam apenas salina i.art., quando administrados hemina, indutor de HO-1, e DMDC, o doador de CO. Fortalecendo essa hipótese, nós observamos que o tratamento com ZnPP IX, um inibidor seletivo da enzima HO-1, causou um aumento da inflamação articular e da hipernocicepção articular, quando utilizada dose submáxima de zymosan (1 mg) para induzir a artrite na ATM, possivelmente por inibir a produção de CO. De fato, no primeiro trabalho da literatura que mostrou os efeitos do CO na dor, publicado em 1994, foi demonstrado que o ZnPP IX reduziu o limiar de hiperalgesia mecânica causada por zymosan (MELLER *et al.*, 1994). Também, no estudo realizado em microscopia intravital, observou-se que o CO

reduziu rolamento, adesão e migração neutrofílica em modelo de inflamação induzida por carragenina, e que essa ação ocorreu via GMPc (FREITAS *et al.*, 2006).

Já foi demonstrado por Steiner *et al.* (2001) que a via HO-1/CO exerce ação antinociceptiva em inflamação induzida por carragenina comprovada pelo uso de um inibidor de HO-1. Esses autores também afirmaram que o CO é o produto da via da HO-1 responsável pela ação antinociceptiva. Sabe-se que a maioria das ações do CO tem sido descritas como dependentes da ativação de guanilato ciclase solúvel (GCs) e subsequente síntese do GMPc (MAINES *et al.*, 1993; 1997; MORITA *et al.*, 1995). Esses efeitos bioquímicos resultam na redução da produção de citocinas pro inflamatórias como TNF α , IL-1 β , IL-6 e IL-8, e aumentam a síntese de IL-10, uma citocina anti-inflamatória (KOBAYASHI *et al.*, 2006, GUILLEN *et al.*, 2008). De fato, há evidência da participação da via hemeoxigenase-1/monóxido de carbono/GMPc na modulação tanto periférica quanto espinhal da dor inflamatória e não inflamatória (STEINER *et al.*, 2001; NASCIMENTO; BRANCO, 2007; 2008; CARVALHO *et al.*, 2011). Ademais, sabe-se que a elevação dos níveis intracelulares de GMPc, gerados a partir do NO, inibe a hipersensibilidade do nociceptor (CUNHA *et al.*, 1999; BEZERRA *et al.*, 2008), e que essa ação se dá pelo aumento da condutância de íons K⁺ pela abertura de canais de potássio sensíveis à ATP direta ou indiretamente pela via da proteína kinase G (SACHS *et al.*, 2004).

A saber, nosso estudo é o primeiro a mostrar a participação da via HO-1/CO/GMPc/canal de K⁺ sensível a ATP na dor facial. Nossos achados são consistentes em afirmar que a via HO-1/CO/GMPc/canal de K⁺ sensível a ATP modula a hipernocicepção articular e artrite na ATM induzida por Zy, visto que tanto ODQ (um inibidor da GCs) (MORO *et al.*, 1996) quanto glibenclamida (bloqueador de canal de K⁺ sensível a ATP) foram capazes de reverter o efeito protetor do DMDC (doador de CO) sobre ambos hipernocicepção articular e artrite na ATM. Em modelo experimental de artrite na ATM induzida por adjuvante de Freund, foi mostrado que este agente é capaz de promover redução da condutância de canais de K⁺ voltagem dependentes, sugerindo que inflamação na ATM aumenta a excitabilidade de neurônios do gânglio trigeminal contribuindo para alodinia na região facial (TAKEDA *et al.*, 2006), o que nos sugere inferir que Zy também pode proporcionar essa ação sobre canais de K⁺, e que o uso de estimuladores da via HO-1/CO pode servir futuramente como ferramenta farmacológica importante na dor facial.

Continuando a investigação da via HO-1/BVD/CO na hipernocicepção articular e na artrite na ATM induzida por Zy, realizamos estudo com biologia molecular para analisar a expressão gênica de HO-1 e sua interligação temporal com a expressão gênica de dois importantes mediadores inflamatórios, TNF α e IL-1 β , tanto em tecidos articulares da ATM, quanto no gânglio trigeminal. No presente trabalho, os resultados obtidos mostram, através de uma avaliação quantitativa em tempo real, a dinâmica da expressão relativa de RNAm de HO-1, TNF- α e IL-1 β em tecidos da ATM de ratos e do gânglio trigeminal após a indução da artrite por Zy.

Observou-se que o RNAm de HO-1, nos tecidos articulares, inicia sua significativa expressão relativa a partir da 6^a h até a 24^a h após indução da artrite por Zy, com um pico de expressão gênica relativa na 9^a h. Esse pico de expressão gênica de HO-1 resultou em aumento de sua atividade, que pôde ser observado pelo aumento da dosagem sérica de bilirrubina também na 9^a h. Os RNAm de TNF α e de IL-1 β iniciam sua expressão relativa já na 3^a h até a 24^a h após a indução da artrite, apresentando pico também na 9^a h.

Em cultura de osteoblastos e condrócitos estimulados por IL-1 β , obtidos de pacientes com osteoartrite, observou-se que a indução de HO-1 reduziu a expressão de MMPs, a produção de citocinas pro inflamatórias como TNF α e IL-6, assim como de PGE2, nitrito, TGF β 2, TGF β 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; CLERIGUES *et al.*, 2012a, 2012b). Também em cultura de condrócitos incubados com IL-1 β , TNF α e IL-17, obtidos de pacientes com osteoartrite, observou-se redução da expressão de HO-1, porém, quando incubados com IL-10 ou nitroprussiato de sódio (doador de NO), houve aumento da expressão de HO-1, embora altos níveis de NO gerado a partir da incubação com IL-1 β não aumentaram a expressão de HO-1 (FERNANDEZ *et al.*, 2003; VALVASON *et al.*, 2008). Em sioviócitos de pacientes com artrite reumatóide (AR), cultivados com IL-1 β , a estimulação de HO-1 reduziu a expressão de fosfolipase A2 (PLA2) via inibição do fator de transcrição AP-1 (CHI *et al.*, 2012). Também, em cultura de sinoviócitos com LPS de pacientes com artrite reumatóide (AR), a síntese de HO-1 foi estimulada por IL-1 e TNF α , e inibida por IFN- γ (KITAMURA *et al.*, 2011), assim como a estimulação de HO-1 inibiu o fator de transcrição NF- κ B inibindo a expressão de IL-1 β , TNF α e IL-6 (PARK *et al.*, 2010). Esses experimentos mostram que as citocinas pro inflamatórias e o NO gerado a partir de IL-1 β exercem suas ações via inibição da

expressão de HO-1, embora em pequenas concentrações o NO aumente a expressão de HO-1. Em contrapartida, em algum momento do processo inflamatório, essas mesmas citocinas induzem a síntese de HO-1 que, por sua vez, exercem sua ação anti-inflamatória pela inibição das mesmas citocinas pro inflamatórias IL-1 β , TNF α e IL-6, assim como inibe a via do NO e das prostaglandinas.

De fato, esse equilíbrio entre os mediadores pro e anti-inflamatórios, ressaltando HO-1, TNF α e IL-1 β , na artrite da ATM induzida por Zy, ocorre de forma concomitante ao longo de todo o processo nociceptivo e inflamatório. Mais especificamente, podemos inferir que TNF α e IL-1 β , ao apresentarem expressão gênica relativa a partir da 3^a h, desencadeiam a hipernocicepção articular, o extravasamento plasmático e o influxo leucocitário. Semelhante ao nosso resultado, foi encontrada também expressão gênica aumentada de TNF α em tecidos articulares em artrite na ATM induzida por adjuvante de Freund, sugerindo que o TNF α exerce exatamente essa função de desencadear todo o processo inflamatório articular (SPEARS *et al.*, 2003). Esses mesmo autores estudaram o curso-temporal de TNF α e IL-1 β na artrite induzida por CFA a partir de 2 dias se estendendo até a 6^a semana. Foi encontrado que TNF α e IL-1 β se mantêm até a 2^a semana (SPEARS *et al.*, 2005). Nosso estudo se estendeu até a 24^a h, necessitando de uma continuidade para identificar a atuação de TNF α e IL-1 β na fase crônica da artrite na ATM induzida por Zy. Em relação à HO-1, possivelmente em resposta a todo processo inflamatório, iniciar-se-ia a expressão gênica relativa de HO-1 a partir da 6^a h após indução da artrite por Zy na tentativa de proteger os tecidos articulares. Ou seja, a expressão gênica e a posterior síntese dessas proteínas (HO-1, TNF α e IL-1) têm impacto em ambos homeostase e condições patológicas na ATM, desempenhando papel fundamental na patogênese da dor facial e da inflamação na ATM, ativando ou inibindo vias inflamatórias e degenerativas.

No presente estudo, a análise por imunohistoquímica mostrou aumento da expressão de HO-1 na ATM de animais com artrite induzida por Zy em sinoviócitos, condrócitos e neutrófilos que migraram para tecido articular, sugerindo que essas células estejam envolvidas na síntese de citocinas e podem ser moduladas pela via HO-1/BVD/CO. Foi demonstrado que a enzima HO-1 é altamente expressa em sinoviócitos, em linfócitos do infiltrado celular, em células endoteliais no tecido sinovial, em condrócitos e em células mononucleares do sangue periférico de pacientes com artrite reumatóide (AR) e osteoartrite (OA). Ademais, ambas células

sinoviais e condrócitos são capazes de produzir citocinas inflamatórias, que são reduzidas pelo aumento de HO-1 (FERNANDEZ *et al.*, 2003; KOBAYASHI *et al.*, 2006; KIRINO 2007; GUILLEN *et al.*, 2008, VALVASON *et al.*, 2008; KITAMURA *et al.*, 2011).

Além disso, nós observamos que HO-1 se expressa de forma tênue em ATM de animais sham, sugerindo a participação da via na fisiologia da ATM, provavelmente devido ao fato de ser esta uma articulação sujeita a contínuo estresse mecânico, havendo a necessidade de futuras pesquisas para elucidar o papel fisiológico desta enzima na ATM. Em trabalho anterior, mostramos que outra enzima indutiva, como NOSi, também se expressa de forma constitutiva em sinoviócitos e condrócitos, exercendo também um papel fisiológico no sistema (CHAVES *et al.*, 2011).

Identificamos também, por imunohistoquímica, as células responsáveis pela expressão gênica de TNF α e de IL-1 β nos tecidos articulares. De fato, TNF α e IL-1 β foram expressos nas células residentes condrócitos e sinoviócitos, e nos neutrófilos que migraram para o tecido sinovial. Observamos, porém, que a imunomarcagem para IL-1 β em neutrófilos ocorre de forma mais intensa do que a imunomarcagem para TNF α . Em artrite no joelho induzida por Zy, certificou-se que a principal fonte de TNF α são células residentes articulares, ao invés de neutrófilos que migram para o tecido, ao se utilizar animais depletados de neutrófilos e ainda assim a dosagem de TNF α no lavado articular permanecer elevada (PETTIPHER; SALTER, 1996). Esse dado corrobora com a ideia de que TNF α é primeiramente estimulado por células residentes na ATM para seguir à sequência de estimulação das demais citocinas e desencadear os eventos inflamatórios. Ademais, em modelo de artrite na ATM induzida por antígeno, foi demonstrado que sinoviócitos e células inflamatórias que infiltraram para os tecidos articulares são capazes de sintetizar IL-1 β , assim como condrócitos em uma fase mais tardia da artrite (HABU *et al.*, 2002). Observa-se, novamente, que os achados dependem do tipo de estímulo inflamatório utilizado para induzir artrite, já que na 6^a h após indução da artrite já observamos imunomarcagem em condrócitos, porém não realizamos imunohistoquímica em uma fase mais tardia para avaliar por qual células esses mediadores são produzidos.

Observamos também que a expressão gênica de IL-1 β em tecido articulares da ATM com artrite induzida por Zy resultou na síntese desse mediador inflamatório, quando dosado no lavado sinovial, encontrando-se aumentada nos

animais com artrite na ATM. Em pacientes com artrite na ATM, IL-1 β foi identificada no lavado sinovial (KUBOTA *et al.*, 1997; 1998; KOPP, 1998; ALSTERGREN *et al.*, 1998; 1999; 2003; SHINODA & TAKAKU, 2000; NISHIMURA *et al.*, 2004; TOMINAGA *et al.*, 2004; MATSUMOTO *et al.*, 2008; VERNAL *et al.*, 2008), e foram identificadas as células responsáveis pela sua síntese, a saber condrócitos (SASAKI *et al.*, 1998; GE *et al.*, 2011), células da cartilagem articular (MARTEL-PELLETIER *et al.*, 1991), e sinoviócitos tipo B (fibroblastos-símile) (SUZUKI *et al.*, 2002; TOBE *et al.*, 2002; OGURA *et al.*, 2002; 2007; 2009; SATOH *et al.*, 2009). Estudos reportam que IL-1 β , ao estimular sinoviócitos tipo B (fibroblastos-símile) em meio de cultura de células oriundas de pacientes com artrite na ATM, promovem o aumento da expressão gênica de uma série de genes responsáveis pela síntese de mediadores como IL-6, IL-8 e PGs, exercendo seu papel fundamental na amplificação e na perpetuação da resposta inflamatória articular (OGURA *et al.*, 2002; TOBE *et al.*, 2002; OGURA *et al.*, 2007; SATOH *et al.*, 2009). Ademais, foi identificado que IL-1 β estimula a expressão gênica da proteína Bfl-1/A1, que é membro da família Bcl-2, que também inclui Bcl-2 e Bcl-x, estando relacionadas à apoptose (OGURA *et al.*, 2009).

Similarmente, TNF α também foi encontrado no lavado sinovial de pacientes com artrite na ATM (SHAFER *et al.*, 1994; FU *et al.*, 1995a; NORDAHL *et al.*, 2000; EMSHOFF *et al.*, 2000; KANEYAMA *et al.*, 2002; SUZUKI *et al.*, 2002; MATSUMOTO *et al.*, 2008; VERNAL *et al.*, 2008), sendo sintetizado por células do tecido articular como sinoviócitos tipo B (fibroblastos-símile) (OGURA *et al.*, 2005; KE *et al.*, 2007). Também, em estudo com sinoviócitos tipo B (fibroblastos-símile) oriundos de pacientes com artrite na ATM, TNF α foi capaz de promover o aumento da expressão gênica de genes responsáveis pela síntese de mediadores como IL-8 (OGURA *et al.*, 2005).

O aumento na expressão de HO-1, TNF α e IL-1 β envolve um grande número de fatores de transcrição e de mediadores inflamatórios que são ativados pela indução da artrite. O fato de HO-1, TNF- α e IL-1 β apresentarem um pico de expressão gênica na 9^a h após a indução da artrite por Zy possivelmente ocorre devido a uma das vias de indução da expressão de RNAm da HO-1, a via do fator de transcrição NF-kB (GERALDES *et al.*, 2008, LAVROVSKY *et al.*, 1994), também ser utilizada para a indução da expressão das citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β) (ANISOWICZ *et al.*, 1991). A expressão de HO-1 pode também ser regulada por

outros fatores de transcrição, dentre eles o fator induzido por hipóxia-1 (HIF-1), Nrf2 e o AP-1 (ALAM; COOK, 2003; KOBAYASHI *et al.*, 2006; LAVROVSKY *et al.*, 1994; LEE *et al.* 1997). Além disso, Hollander *et al.* (2001) reportaram que o HIF-1 α é abundantemente expresso em tecidos sinoviais das articulações com artrite reumatóide. A dinâmica da expressão gênica e da síntese HO-1, TNF α e IL-1 β na artrite da ATM induzida por Zy precisa, portanto, ser melhor elucidada, podendo-se utilizar de estudos mais específicos envolvendo a via molecular através da expressão gênica dos fatores de transcrição, assim como pelo estudo da dinâmica de inter-relação entre os mediadores, abrindo espaço para estudos futuros.

No gânglio trigeminal, observamos que o RNAm de HO-1 se expressa apenas na 12^a h, e que o RNAm de TNF α se expressa na 6^a h e 12^a h após indução da artrite. O RNAm para IL-1 β inicia sua expressão relativa a partir da 6^a h até a 24^a h após indução da artrite por Zy, com um pico de expressão gênica relativa na 12^a h. De fato, entre a 3^a h e 4^a h após a indução da artrite, há o pico de hipernocicepção articular provavelmente ocasionado pela liberação periférica tecidual de TNF α e IL-1 β , o que estimula o neurônio aferente primário a sintetizar esses mediadores em um momento posterior, a partir da 6^a h para IL-1 β e TNF α e na 12^a h para HO-1. Semelhante ao observado na ATM, também no gânglio trigeminal há uma expressão gênica relativa conjunta na 12^a h de todas os genes estudados, provavelmente devido ao fato de que alguns fatores de transcrição para esses genes são semelhantes, como discutido acima. Ressalta-se que na 12^a h, quando o gene de HO-1 se expressa no neurônio, há uma crescente redução de hipernocicepção articular.

Sabe-se que HO-2, a enzima constitutiva da via HO, é constitutivamente expressa em altos níveis no sistema nervoso central em ambas células neuronais e células da glia, e que é expressa abundantemente em neurônios da medula espinhal, mesencéfalo, gânglios da base, região de tálamo e tronco encefálico (FAN *et al.*, 2011). Há evidências também da expressão de HO-2 em sistema nervoso periférico em gânglios sensoriais do corno dorsal da medula espinhal na região cervical e lombar e no gânglio trigeminal, sugerindo que o CO atua como neurotransmissor (UDDMAN *et al.*, 2004; FAN *et al.*, 2008; 2009; 2011). Fan *et al.* (2011) discutiram que ainda não há indícios da via HO-1/CO no neurônio aferente primário seja em dor inflamatória ou em dor neuropática. Nosso estudo mostrou expressão de HO-1 no gânglio trigeminal, sugerindo a participação da via HO-1/CO

na modulação da nocicepção articular e ratificando a hipótese da participação do CO como neurotransmissor e/ou neuromodulador do sistema trigeminal atuando, portanto, na fisiopatologia da dor facial. Não se sabe, ainda, se esse CO gerado é liberado no subnúcleo caudal do trato espinhal do trigêmio, atuando na neurotransmissão e/ou neuromodulação, ou se é liberado antidromicamente, atuando na periferia. Maiores estudos, portanto, são necessários para a compreensão dos mecanismos periféricos e centrais nos diferentes estágios da dor e o envolvimento de HO-1 nesses processos.

Confirmando a discussão anterior, para identificar os tipos celulares responsáveis pela expressão gênica de HO-1, TNF α e IL-1 β no gânglio trigeminal, foi realizado estudo por imunohistoquímica em que se observou que tanto o corpo celular do neurônio aferente primário quanto as células satélites da glia mostraram aumento da expressão de HO-1, TNF α e IL-1 β em animais com artrite na ATM induzida por Zy. Foi descrito que TNF α atua na plasticidade neuronal do gânglio trigeminal ao estimular mediadores como peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) (BOWEN *et al.*, 2006) e fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (BAŁKOWIEC-ISKRA *et al.*, 2011), que atuam na plasticidade sináptica e na sensibilização do nociceptor. De forma semelhante, IL-1 β também é capaz de estimular neurônios do gânglio trigeminal a sintetizar mediadores como CGRP e PGE2 perpetuando a sensibilização neuronal (NEEB *et al.*, 2011). Em modelo experimental de artrite na ATM induzida por CFA, observou-se que IL-1 β contribui para a hiperalgesia inflamatória trigeminal ao inibir canais de K⁺ voltagem dependentes em neurônios do gânglio trigeminal (TAKEDA *et al.*, 2008). Ao observarmos que a via HO-1/CO estimula canais de K⁺ no modelo de artrite por Zy, provavelmente um equilíbrio a favor dessa via, irá atuar na redução da hiperalgesia inflamatória trigeminal.

Sabe-se que as células satélites da glia promovem suporte metabólico e estrutural e modulam a excitabilidade neuronal no gânglio trigeminal, atuando tanto na gênese quanto na manutenção da dor crônica (VILLA *et al.*, 2010; CHIANG *et al.*, 2011). Foi descrito que a inflamação periférica na articulação temporo-mandibular é capaz de aumentar a excitabilidade das células satélites da glia atuando em neurônios do gânglio trigeminal (TAKEDA *et al.*, 2007; VILLA *et al.*, 2010). TAKEDA *et al.* (2007) mostraram que a injeção de adjuvante de Freund na ATM dos animais levou as células satélites da glia a sintetizarem IL-1 β , atuando na modulação da

excitabilidade dos neurônios do gânglio trigeminal. Esse mesmo grupo de pesquisa mostrou também uma ação parácrina da IL-1 β sintetizada pelas células satélites da glia estimulando os neurônios do gânglio trigeminal a expressarem receptores de IL-1 β , mostrando sua importância no processo de hiperalgesia facial (TAKEDA *et al.*, 2008). Sabe-se, também, que a inibição de conexinas nas células satélites da glia no gânglio trigeminal reduz a hiperalgesia facial (JASMIN *et al.*, 2010), e que há aumento da expressão de conexinas na presença de inflamação na ATM (GARRETT; DURHAM, 2008). Ou seja, o papel principal das células satélites da glia no desenvolvimento e na manutenção da dor ocorre pelo aumento da expressão e liberação de IL-1 β (TAKEDA *et al.* 2007; 2008), assim como pelo aumento das junções do tipo gap através das conexinas com os neurônios (GARRETT; DURHAM, 2008; JASMIN *et al.*, 2010).

Nosso estudo mostrou que as células satélites da glia são capazes de expressar TNF α e IL-1 β em resposta à artrite na ATM induzida por zymosan, modulando o neurônio aferente primário assim como, possivelmente, neurônios do sistema nervoso central, o que leva à hiperalgesia e alodinia. Ademais, a expressão de HO-1 pelas células satélites da glia podem levar à síntese de CO que pode exercer também uma ação parácrina sobre os neurônios do gânglio trigeminal e do sistema nervoso central, reduzindo a excitabilidade neuronal, atuando no controle da plasticidade sináptica e reduzindo a sensibilização do nociceptor, e, portanto, modulando o processo nociceptivo facial. O caminho pelo qual esses processos ocorrem, entretanto, precisam ainda ser investigados, sendo um possível mecanismo a ser estudado como ação da via HO-1/CO. O que se sugere é esse novo possível alvo terapêutico da via HO-1/CO em células satélites da glia no tratamento das dores orofaciais.

6. CONCLUSÕES

1. O modelo de hipernocicepção articular e artrite na articulação temporomandibular induzida por zymosan em ratos padronizado neste trabalho pode ser utilizado para o estudo da fisiopatologia da dor facial e da inflamação na ATM;
2. O modelo permitiu estudar as alterações histopatológicas nas fases aguda e crônica da artrite, sendo, portanto, confiável para a investigação da fisiopatologia das alterações inflamatórias e degenerativas na ATM, podendo ser reproduzido em estudos posteriores;
3. O modelo de inflamação na ATM induzida por Zy é capaz de estimular neurônios e células satélites da glia do gânglio trigeminal, e é capaz desencadear efeitos sistêmicos;
4. O presente trabalho sugere a participação da via hemeoxigenase-1/biliverdina/monóxido de carbono na patogênese da hipernocicepção articular e da artrite na articulação temporomandibular induzida por Zy;
5. A via HO-1/CO/GMPc/canal de K^+ sensível a ATP está envolvida na hipernocicepção articular e na artrite da ATM induzida por Zy;
6. HO-1, $TNF\alpha$ e $IL-1\beta$ participam da fisiopatologia da hipernocicepção articular e da artrite na articulação temporomandibular induzida por Zy, sendo produzidos em tecidos articulares assim como por neurônios aferentes e células satélites da glia do gânglio trigeminal.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, N. G.; LIN, J. H.; MITRIONE, S. M.; SCHWARTZMAN, M. L.; LEVERE, R. D.; SHIBAHARA, S. Expression of heme oxygenase gene in rat and human liver. **Biochem Biophys Res Commun**, (150): 717-722, 1988.
- ALCARAZ, M.J.; FERNANDEZ, P.; GUILLEN, M.I. Anti-inflammatory actions of the heme oxygenase-1 pathway. **Curr Pharm Desig** (9): 2541–2551, 2003.
- ALAM, J.; COOK, J.L. Transcriptional regulation of the heme oxygenase-1 gene via the stress response element pathway. **Curr Pharm Des.**, v. 9, n. 30, p. 2499-511, 2003.
- ALI, A.M.; SHARAWY, M.M. Histopathological changes in rabbit craniomandibular joint associated with experimentally induced anterior disk displacement (ADD). **J Oral Pathol Med.**, v. 23, n. 8, p. 364-74, 1994.
- ALMEIDA, T.F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Res.**, v.1000, p.40-56, 2004.
- AL-MOBIREEK, A.; DARWAZEH, A. M. G.; HASSANIN, M. B. Experimental induction of reumatoid arthritis in temporomandibular joint of the guinea pig: a clinical and radiographic study. **Dentomaxillofac. Radiol.**, v. 29, p. 286-290, 2000.
- ALOMAR, X.; MEDRANO, J.; CABRATOSA, J.; CLAVERO, J.A.; LORENTE, M.; SERRA, I.; MONILL, SALVADOR, A. Anatomy of the temporomandibular joint. **Seminars in Ultrasound, CT, and MRI**, v.28 n.3 p.170-183, 2007.
- ALSTERGREN, P.; APPELGREN, A.; APPELGREN, B.; KOOP, S.; LUNDEBERG, T.; THEODORSSON E. Co-variation of neuropeptide Y, calcitonin gene-related peptide, substance P and neurokinin A in joint fluid from patients with temporomandibular joint arthritis. **Arch Oral Biol.**, v. 40, n. 2, p.127-35, 1995.
- ALSTERGREN, P.; ERNBERG, M.; KVARNSTRÖM, M.; KOOP, S. Interleukin 1 β in synovial fluid from the arthritic temporomandibular joint and its relation to pain, mobility, and anterior open bite. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 6, n. 9, p. 1059-1065, 1998.
- ALSTERGREN, P.; KOOP, S.; THEODORSSON, E. Synovial fluid from the temporomandibular joint: sample quality criteria and levels of interleukin-1 β and serotonin. **Acta Odontol. Scand.**, v. 57, n. 1, p. 16-22, 1999.
- ALSTERGREN P. Cytokines in temporomandibular joint arthritis. **Oral Dis.**, v. 6, p. 331-334, 2000.
- ALSTERGREN, P.; BENAVENTE, C.; KOOP, S. Interleukin 1 β , Interleukin 1 receptor antagonist, and Interleukin 1 soluble receptor II in temporomandibular joint synovial fluid from patients with chronic polyarthritides. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 61, n. 10, p. 1171-1178, 2003.

ARINCI, A.; ADEMOGLU, E.; ASLAN, A.; MUTLU-TURKOGLU, U.; KARABULUT, A. B.; KARAN, A. Molecular correlates of temporomandibular joint disease. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 99, n. 6, p. 666-670, 2005.

BAKKEN, A.F.; THALER, M.M.; SCHMID, R. Metabolic regulation of heme catabolism and bilirubin production. I. Hormonal control of hepatic heme oxygenase activity. **J Clin Invest**, v. 51, p. 530-536, 1972.

BAŁKOWIEC-ISKRA, E.; VERMEHREN-SCHMAEDICK, A.; BALKOWIE, A. Tumor necrosis factor- α increases brain-derived neurotrophic factor expression in trigeminal ganglion neurons in an activity-dependent manner. **Neuroscience.**, v. 28, n. 180; p.322-33, 2011.

BARANANO DE, SNYDER SH. Neural roles for heme oxygenase: contrasts to nitric oxide synthase. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 98, p.10996–11002, 2001.

BENALLAOUA M, FRANCOIS M, BATTEUX F, THELIER N, SHYY JY, FITTING C, et al. Pharmacologic induction of heme oxygenase 1 reduces acute inflammatory arthritis in mice. **Arthritis Rheum.**, v. 56, p.2585–94, 2007.

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 Pharmacol**, v. 374, n. 4, p. 265–273, 2007.

BEZERRA, M.M.; LIMA, V.; GIRÃO, V.C.C.; TEIXEIRA, R.C.; GRAÇA, J.R.V. Antinociceptive activity of sildenafil and adrenergic agents in the writhing test in mice. **Pharmacol Rep**, v. 60, p. 339–344, 2008.

BONELLI, M.; SAVITSKAYA, A.; STEINER, C.W.; RATH, E.; BILBAN, M.; WAGNER, O.; BACH, F.H.; SMOLEN, J.S.; SCHEINECKER, C. Heme oxygenase-1 end-products carbon monoxide and biliverdin ameliorate murine collagen induced arthritis. **Clin Exp Rheumatol.**, v. 30, n. 1, p. 73-8, 2012.

BOWEN EJ, SCHMIDT TW, FIRM CS, RUSSO AF, DURHAM PL. Tumor necrosis factor-alpha stimulation of calcitonin gene-related peptide expression and secretion from rat trigeminal ganglion neurons. **J Neurochem.**, v. 96, n. 1, p. 65-77, 2006.

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

BROTON, J.G.; SESSLE, B.J. Reflex excitation of masticatory muscle induced by algogenic chemicals applied to the temporomandibular joint of the cat. **Arch. Oral Biol.**, v. 33, p. 741-747, 1988.

BUSSOLATI, B.; AHMED, A.; PEMBERTON, H.; LANDIS, R.C.; DI CARLO, F.; HASKARD, D.O., et al. Bifunctional role for VEGF-induced heme oxygenase-1 in vivo: induction of angiogenesis and inhibition of leukocytic infiltration. **Blood**, v. 103, p. 761-6, 2004.

CAIRNS, B.E.; SESSLE, B.J.; HU, J.W. Evidence that excitatory amino acid receptors within the temporomandibular joint region are involved in the reflex activation of the jaw muscles. **J. Neurosci.**, v. 18, p. 8056-8064, 1998.

CAIRNS, B.E.; SESSLE, B.J.; HU, J.W. Characteristics of glutamate-evoked temporomandibular joint afferent activity in the rat. **J. Neurophysiol.**, v. 85, n. 6, p. 2446-2454, 2001.

CAIRNS B.E. Pathophysiology of TMD pain – basic mechanisms and their implications for pharmacotherapy. **J Oral Rehabil.**, v. 37(6), p. 391-410, 2010.

CAMHI, S. L.; ALAM, J.; OTTERBEIN, L.; SYLVESTER, S. L.; CHOI, A. M. Induction of heme oxygenase-1 gene expression by lipopolysaccharide is mediated by AP-1 activation. **Am J Respir Cell Mol Biol.**, v.13, p. 387-398, 1995.

CARLESON, J.; ALSTERGREN, P.; APPELGREN, A.; APPELGREN, B.; KOOP, S.; THEODOESSON, E.; LUNDEBERG, T. A model for experimental induction of acute temporomandibular joint inflammation in rats: effects of substancia P (SP) on neuropeptide-like immunoreactivity. **Life. Sci.**, v. 59, n. 15, p. 1193-1201, 1996.

CARVALHO, P.G.; BRANCO, L.G.S.; LEITE- PANISSI, C.R.A. Involvement of the heme oxygenase–carbon monoxide–cGMP pathway in the nociception induced by acute painful stimulus in rats. **Brain Res.**, v. 1385, p. 107 – 113, 2011.

CHANG, H.; ISRAEL, H. Analysis of inflammatory mediators in temporomandibular joint synovial fluid lavage samples of symptomatic patients and asymptomatic controls. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 63, n. 6, p. 761-765, 2005.

CHAVES, H. V.; LEITÃO, A. K. A.; FARRAPO, A. R.; RIBEIRO, R. A.; BRITO, G. A. C. 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.; RIBEIRO, R.A.; SOUZA, A.M.B.; SILVA, A.A.R.; GOMES, A.S.; VAL, 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 Biotech**, v. 2011:ID 707985,11 pages, 2011.

CHI, P.L.; CHEN, Y.W.; HSIAO, L.D.; CHEN, Y.L.; YANG, C.M. HO-1 attenuates IL-1 β -induced cPLA(2) expression via a decrease in NADPH oxidase/ROS/AP-1 activation in human rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. **Arthritis Rheum.**, 2012 Jan 9. doi: 10.1002/art.34371. [Epub ahead of print]

CHIANG, C.; JONATHAN, O.; DOSTROVSKY, K.I.; SESSLE, B.J. Role of Glia in Orofacial Pain. **The Neuroscientist**, v. 17, n. 3, p. 303–320, 2011.

CHICRE-ALCÂNTARA, T.C.; TORRES-CHÁVEZ, K.E.; FISCHER, L.; CLEMENTE-NAPIMOGA, J.T.; MELO, V.; PARADA, C.A.; TAMBELI, C.H. Local kappa opioid receptor activation decreases temporomandibular joint inflammation. *Inflammation.*, v. 35, n. 1, p. 371-6, 2012.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N.; SINGLE-STEP. Method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.*, v.162, p.156-159, 1987.

CHU, C. Q.; FIELD, M.; FELDMANN, M.; MAINI, R. N. Localization of tumor necrosis factor alpha in synovial tissues and at the cartilage-pannus junction in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, v. 34, n. 9, p. 1125-1132, 1991.

CIANCAGLINI, R.; RADAELLI, G. The relationship between headache and symptoms of temporomandibular disorder in the general population. *J. Dent.*, v. 29, n. 2, p. 93-98, 2001.

CLÉRIGUES, V.; GUILLÉN, M.I.; CASTEJÓN, M.A.; GOMAR, F.; MIRABET, V.; ALCARAZ, M.J. Heme oxygenase-1 mediates protective effects on inflammatory, catabolic and senescence responses induced by interleukin-1 β in osteoarthritic osteoblasts. *Biochem Pharmacol.*, v. 83, n. 3, p. 395-405, 2012a.

CLÉRIGUES, V.; GUILLÉN, M.I.; GOMAR, F.; ALCARAZ, M.J. Haem oxygenase-1 counteracts the effects of interleukin-1 β on inflammatory and senescence markers in cartilage-subchondral bone explants from osteoarthritic patients. *Clin Sci.*, v.122, n. 5, p. 239-50, 2012b.

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.

COMERFORD, F. R.; ETWEBI, A. B. Zymozan arthritis: a model of inflammatory erosive joint disease. *Ann. Rheum. Dis.*, v. 54, n. 6, p. 527-528, 1995.

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, n. 4, p. 364-9, 2012.

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

CUNHA, F.Q.; TEIXEIRA, M.M.; FERREIRA, S.H. Pharmacological modulation of secondary mediator systems-cyclic AMP and cyclic GMP on inflammatory hyperalgesia. *Br. J. Pharmacol.*, v. 127, p. 671- 678, 1999.

DATTA, P.K.; LIANOS, E.A. Nitric oxide induces heme oxygenase-1 gene expression in mesangial cells. **Kidney Int.**, v. 55, p. 1734–1739, 1999.

DE LEEUW, R. **Orofacial Pain: Guidelines for Assessment, Diagnosis, and Management**. 4^a ed. São Paulo: Quintessence, 2008.

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.

DELEURAN, B.W.; CHU, C.Q.; FIELD, M.; BRENNAN, F.M.; MITCHELL, T.; FELDMANN, M.; MAINI, R.N. Localization of tumor necrosis factor receptors in the synovial tissue and cartilage-pannus junction in patients with rheumatoid arthritis. Implications for local actions of tumor necrosis factor alpha. **Arthritis Rheum.**, v. 35, n. 10, p. 1170-1178, 1992.

DEVESA, I.; FERRANDIZ, M.L.; GUILLEN, I.; CERDA, J.M.; ALCARAZ, M.J. Potential role of heme oxygenase-1 in the progression of rat adjuvant arthritis. *Lab. Invest.*, v. 85, p. 34–44, 2005a.

DEVESA, I.; FERRANDIZ, M.L.; TERCENIO, M.C.; JOOSTEN, L.A.B.; VAN DEN BERG, W.B.; ALCARAZ, M.J. Influence of Heme Oxygenase 1 Modulation on the Progression of Murine Collagen-Induced Arthritis. *Arthritis Rheumat*, v. 52, n. 10, p. 3230–3238, 2005b.

DINARELLO, C. A. Interleukin-1, Interleukin-1 receptors and Interleukin-1 receptor antagonist. **Int. Rev. Immunol.**, v. 16, p. 457-499, 1998.

DINARELLO, C. A.; WOLFF, S. M. The role of interleukin-1 in disease. **N. Engl. J. Med.**, v. 328, n. 2, p. 106-113, 1993.

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. **Br J Cancer** (80): 1945-1954, 1999.

DWORKIN, S.F.; LERESCHE, L. Research diagnostic criteria for temporomandibular disorders. **J Craniomandib Disord**, v. 6:302–55, 1992.

EDWARDS, S. W.; HUGHES, V.; BARLOW, J.; BUCKNALL, R. Immunological detection of myeloperoxidase in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis. **Biochem. J.**, v. 250, n. 1, p. 81-85, 1988.

EMBREE M, ONO M, KILTS T, WALKER D, LANGGUTH J, MAO J, BI Y, BARTH JL, YOUNG M. Role of subchondral bone during early-stage experimental TMJ osteoarthritis. **J Dent Res.**, v. 90, n. 11, p. 1331-8, 2011.

EMSHOFF, R.; PUFFER, P.; RUDISCH, A.; GABNER, R. Temporomandibular joint pain: relationship to internal derangement type, osteoarthrosis, and synovial fluid

mediator level of tumor necrosis factor- α . **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 90, p. 442-449, 2000.

FAN, W.; DONG, W.; LENG, S.; LI, D.; CHENG, S.; LI, C.; Qu H, HE, H. Expression and colocalization of NADPH-diaphorase and heme oxygenase-2 in trigeminal ganglion and mesencephalic trigeminal nucleus of the rat. **J Mol Histol**, v. 39, p.427-433, 2008.

FAN, W.; HUANG, F.; DONG, W.; GAO, Z.; LI, C.; ZHU, X.; LI, D.; HE, H. Distribution of heme oxygenase-2 and NADPH-diaphorase in the spinal trigeminal nucleus of the rat. **J Mol Histol**, v. 40, n. 3, p. 209-15, 2009.

FAN, W.; HUANG, F.; WU,Z.; ZHU, X.; LI, D.; HE, H. Carbon Monoxide: A Gas That Modulates Nociception. **J Neurosci Res**, v. 89, p.802-807, 2011.

FANG, P.; MA, X.; MA, D.; FU, K. Determination of interleukin-1 receptor antagonist, interleukin-10, and transforming growth factor- α in synovial fluid aspirates of patients with temporomandibular disorders. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 57, n. 8, p. 922-928, 1999.

FERNANDEZ, F.; GUILLEN, M.I.; GOMARC, F.; ALCARAZ, M.J. Expression of heme oxygenase-1 and regulation by cytokines in human osteoarthritic chondrocytes **Biochemical Pharmacology**, v. 66, p. 2049–2052, 2003.

FERRÁNDIZ, M.L.; MAICAS, N.; GARCIA-ARNANDIS, I.; TERCENIO, M.C.; MOTTERLINI, R.; DEVESA, I.; JOOSTEN, L.A.; VAN DEN BERG, W.B.; ALCARAZ, M.J. Treatment with a CO-releasing molecule (CORM-3) reduces joint inflammation and erosion in murine collagen-induced arthritis. **Ann Rheum Dis.**, v. 67, n. 9, p. 1211-7, 2008.

FERREIRA, S.H.; LORENZETTI, B.B.; CORRÊA, F.M. Central and peripheral antialgesic action of aspirin-like drugs. **Eur J Pharmacol.** v. 15, n. 53, p. 39-48, 1978.

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

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.

FREDRIKSSON, L.; ALSTERGREN, P.; KOPP, S. Serotonergic mechanisms influence the response to glucocorticoid treatment in TMJ arthritis. **Mediators Inflamm.**, v. 2005, n. 4, p. 194-201, 2005.

FREITAS, A.; ALVES-FILHO, J.C.; SECCO, D.D.; NETO, A.F.; FERREIRA, S.H.; BARJA-FIDALGO, C.; CUNHA, F.Q. Heme oxygenase/carbon monoxide-biliverdin pathway down regulates neutrophil rolling, adhesion and migration in acute inflammation. **Br J Pharmacol.**, v.149, n.4, p.345-54,. 2006.

FU, K.; MA, X.; ZHANG, Z.; CHEN, W. Tumor necrosis factor in synovial fluid of patients with temporomandibular disorders. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 53, n. 4, p. 424-426, 1995.

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.

FURSTMAN, L. L. Normal age changes in the rat mandibular joint. **J. Dent. Res.**, v. 45, n. 2, p. 291-296, 1966.

GADO K.; GIGLER G. Zymosan inflammation: a new method suitable for evaluating new antiinflammatory drugs. **Agents and Actions**, v. 32, n. 1-2, p. 119–121, 1991.

GARRETT, F.G.; DURHAM, P.L. Differential expression of connexins in trigeminal ganglion neurons and satellite glial cells in response to chronic or acute joint inflammation. **Neuron Glia Biol**, v. 4, p. 295-306, 2008.

GAZDA, L. S.; MILLIGAN, E. D.; HANSEN M. K. Sciatic inflammatory neuritis (SIN): behavioral allodynia is paralleled by peri-sciatic proinflammatory cytokine and superoxide production. **J Peripheral Nervous System**, v. 6, n. 3, p. 111–129, 2001.

GE, X.P.; GAN, Y.H.; ZHANG, C.G.; ZHOU, C.Y.; MA, K.T.; MENG, J.H.; MA, X.C. Requirement of the NF- κ B pathway for induction of Wnt-5A by interleukin-1 β in condylar chondrocytes of the temporomandibular joint: functional crosstalk between the Wnt-5A and NF- κ B signaling pathways. **Osteoarthritis Cartilage.**, v. 19, n. 1, p. 111-7, 2011.

GEGOUT, P.; GILLET, P.; CHEVRIER, D.; GUINGAMP, C.; TERLAIN, B.; NETTER, P. Characterization of zymosan-induced arthritis in rats: effects on joint inflammation and cartilage metabolism. **Life. Sci.**, v. 55, n. 17, p. 321-326, 1994.

GERALDES, P.; YAGI, A.; OHSHIRO, Y. Selective regulation of heme oxygenase-1 expression and function by insulin through IRS1/phosphoinositide 3-kinase/Akt-2 pathway. **J Biol Chem**, v. 283, p. 34327–34336, 2008.

GONÇALVES DA, DAL FABBRO AL, CAMPOS JA, BIGAL ME, SPECIALI JG. Symptoms of temporomandibular disorders in the population: an epidemiological study. **J Orofac Pain.**, v. 24, n. 3, p. 270-8, 2010.

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.

GRANGEIRO, N.N.G; AGUIAR, J.A.; CHAVES, H.V.; SILVA, A.A.R.; LIMA, V.; BENEVIDES, N.M.B.; BRITO, G.A.C.; GRAÇA, 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. **Pharmacologic Report**, v. 63, p. 112-119, 2011.

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.

GRIFFITHS, R. J.; LI, S. W.; WOOD, B. E.; BLACKMAN, A. A comparison of the anti-inflammatory activity of selective 5-lipoxygenase inhibitors with dexamethasone and colchicines in a model of zymozan induced inflammation in the rat knee-joint and peritoneal cavity. **Agents Actions**, v. 32, n. 2-3, p. 312-320, 1991.

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.

HAAS, D.A.; NAKANISHI, O.; MACMILLAN, R.E.; JORDAN, R.C.; HU, J.W. Development of an orofacial model of acute inflammation in the rat. **Arch. Oral Biol.**, v. 37, n. 5, p. 417-422, 1992.

HABU, M.; TOMINAGA, K.; SUKEDAI, M.; ALSTERGREN, P.; OHKAWARA, S.; KOPP, S.; FUKUDA, J. Immunohistochemical study of interleukin-1beta and interleukin-1 receptor antagonist in an antigen-induced arthritis of the rabbit temporomandibular joint. **J Oral Pathol Med.**, v. 31, n.1, p, 45-54, 2002.

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

HAYASHI, S.; TAKAMIYA, R.; YAMAGUCHI, T.; MATSUMOTO, K.; TOJO, S. J.; TAMATANI, T.; KITAJIMA, M.; MAKINO, N.; ISHIMURA, Y.;SUEMATSU, M. Induction of heme oxygenase-1 suppresses venular leukocyte adhesion elicited by oxidative stress: role of bilirubin generated by the enzyme. **Circ Res**, v.85, p. 663-671,1999.

HELMY, E.S.; BAYS, R. A.; SHARAWY, M. Osteoarthrosis of the temporomandibular joint following experimental disc perforation in *Macaca fascicularis*. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 46, p. 979-990, 1988.

HELMY, E.S.; BAYS, R.A.; SHARAWY, M. Hitopatological study of humam TMJ perforated discs with emphasis on synovial membrane response. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 47, n. 10, p. 1048-1052, 1989.

HIROTA, Y.; HABU, M.; TOMINAGA, K.; SUKEDAI, M.; MATSUKAWA, A.; NISHIHARA, T.; FUKUDA, J. Relationship between TNF-alpha and TUNEL-positive chondrocytes in antigen-induced arthritis of the rabbit temporomandibular joint. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 35, n. 2, p. 91-98, 2006.

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

HUALIN, C.; WENLI, X.; DAPENG, L.; XIJING, L.; XIUHUA, P.; QINGFENG, P. The Anti-inflammatory Mechanism of Heme Oxygenase-1 Induced by Hemin in Primary Rat Alveolar Macrophages. **Inflammation.**, v. 35, n.3, p.1087-93, 2012.

IBÁÑEZ, L.; ALCARAZ, M.J.; MAICAS, N.; GUEDE, D.; CAEIRO, J.R.; KOENDERS, M.I.; VAN DEN BERG, W.B.; FERRÁNDIZ, M.L. Up-Regulation of the Inflammatory Response by Ovariectomy in Collagen-Induced Arthritis. Effects of Tin Protoporphyrin IX. **Inflammation**, v. 34, n. 6, p. 585-96, 2011.

IJIMA, Y.; KOBAYASHI, M.; KUBOTA, E. Role of interleukin-1 in induction of matrix metalloproteinases synthesized by rat temporomandibular joint chondrocytes and disc cells. **Eur. J. Oral Sci.**, v. 109, n. 1, p. 50-59, 2001.

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.

ISHIMARU, J.; GOSS, N. A. A model for osteoarthritis of the temporomandibular joint. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 50, n. 1191-1195, 1992.

ISRAEL, H.A.; DIAMOND, B.; SAED-NEJAD, F.; RATCLIFFE, A. The relationship between parafunctional masticatory activity and arthroscopically diagnosed temporomandibular joint pathology. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 57, n. 9, p. 1034-1049, 1999.

JASMIN, L.; VIT, J.P.; BHARGAVA, A.; OHARA, P.T. Can satellite glial cells be therapeutic targets for pain control? **Neuron Glia Biol**, v. 6, p. 63-71, 2010.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, n.6852, p.203–210, 2001.

JUNG, A.; SHIN, B.C.; LEE, M.S.; SIM, H.; ERNST, E. Acupuncture for treating temporomandibular joint disorders: a systematic review and meta-analysis of randomized, sham-controlled trials. **J Dent.**, v. 39, n. 5, p.341-50, 2011.

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, n. 5, p. 418-423, 2002.

KANEYAMA, K.; SEGAMI, N.; SUM, W, SATO, J; FUJIMURA, K. Levels of soluble cytokines factors in temporomandibular joint effusions seen on magnetic resonance images. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 99, p. 411-418, 2005a.

KANEYAMA, K.; SEGAMI, N.; SUM, W.; SATO, J.; FUJIMURA., K. Analysis of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6, interleukin-1beta, soluble tumor necrosis factor receptors I and II, interleukin-6 soluble receptor, interleukin-1 soluble receptor type II, interleukin-1 receptor antagonist, and protein in the synovial fluid of patients with temporomandibular joint disorders. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 99, n. 3, p. 276-284, 2005b .

KAWAI, Y.; KUBOTA, E.; OKABE., E. Reactive oxygen species participation in experimentally induced arthritis of the temporomandibular joint in rats. **J. Dent. Res.**,v. 79, n. 7, p. 1489-1495, 2000.

KAWASHIMA, A.; ODA, Y.; YACHIE, A.; KOIZUMI, S. and NAKANISHI, I., Heme oxygenase-1 deficiency: the first autopsy case. **Hum. Pathol.**, v. 33, p. 125-130, 2002.

KE, J.; LONG, X.; LIU, Y.; ZHANG, Y.F.; LI, J.; FANG, W.; MENG, Q.G. Role of NF- κ B in TNF- α -induced COX-2 Expression in Synovial Fibroblasts from Human TMJ. **J Dent Res.**, v. 86, n.4. p.363-367, 2007.

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

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.

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. **Arthritis Rheum.**, v. 20, n. 7, p. 1396-1401, 1977.

KIRINO, Y.; TAKENO, M.; MURAKAMI, S.; KOBAYASHI, M.; KOBAYASHI, H.; MIURA, K.; IDEGUCHI, H.; OHNO, S.; UEDA, A.; ISHIGATSUBO, Y. Tumor Necrosis Factor α Acceleration of Inflammatory Responses by Down-Regulating Heme Oxygenase 1 in Human Peripheral Monocytes. **Arthrit Rheumat**, v. 56, n. 2, p. 464-475, 2007.

KYRKANIDES, K.; FIORENTINO, P.M.; MILLER, J.H.; GAN, Y.; LAI, Y.; SHAFTEL, S.S.; PUZAS, J.E.; PIANCINO, M.G.; O'BANION, M.K.; TALLENTS, R.S. Amelioration of Pain and Histopathologic Joint Abnormalities in the Col1-IL-1 XAT Mouse Model of Arthritis by Intraarticular Induction of μ -Opioid Receptor Into the Temporomandibular Joint. **Arthrit Rheum**, v. 56, n. 6, p. 2038–2048, 2007.

KITAMURA, A.; NISHIDA, K.; KOMIYAMA, T.; DOI, H.; KADOTA, Y.; YOSHIDA, A.; OZAKI, T. Increased level of heme oxygenase-1 in rheumatoid arthritis synovial fluid. **Mod. Rheumatol.**, v. 21, p. 150–157, 2011.

KOBAYASHI, H.; TAKENO, M.; SAITO, T.; TAKEDA, Y.; KIRINO, Y.; NOYORI, K.; HAYASHI, T.; UEDA, A.; ISHIGATSUBO, Y. Regulatory role of heme oxygenase 1 in inflammation of rheumatoid arthritis. **Arthrit Rheumat**, v. 54, n. 4, p. 1132–1142, 2006.

KONNO, S.; TSURUFUJI, S. Induction of zymozan-air-pouch inflammation in rats and its characterization with reference to the effects of anticomplementary and anti-inflammatory agents. **Br. J. Pharmacol.**, v. 80, n. 2, p. 269-277, 1983.

KOPP, S. The influence of neuropeptides, serotonin, and interleukin 1 β on temporomandibular joint pain and inflammation. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 56, n. 2, p. 189-191, 1998.

KUBOTA, E.; IMAMURA, H.; KUBOTA, T.; SHIBATA, T.; MURAKAMI, K. Interleukin 1 β 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.

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

KWAN, C. L.; HU, J. W.; SESSLE, B. J. Neuroplastic effects of neonatal capsaicin on neurons in adult rat trigeminal nucleus principalis and subnucleus oralis. **J. Neurophysiol.**, v. 75, p. 298-310, 1996.

LAM, D. K.; SESSLE, B. J.; CAIRNS, B. E.; HU, J. W. Peripheral NMDA receptor modulation of jaw muscle electromyographic activity induced by capsaicin injection into the temporomandibular joint of rats. **Brain Res.**, v. 1046, n. 1/2, p. 68-76, 2005.

LEE, P.J.; JIANG, B.H.; CHIN, B.Y.; IYER, N.V.; ALAM, J.; SEMENZA, G.L.; CHOI, A.M. Hypoxia-inducible factor-1 mediates transcriptional activation of the heme oxygenase-1 gene in response to hypoxia. **J Biol Chem**, v. 272, p. 5375–81, 1997.

LEKKAS, C. Experimental degenerative temporomandibular joint disease. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 23, p. 423-424, 1994.

LIPTON, J.A.; SHIP, J.A.; LARACH-ROBINSON, D. Estimated prevalence and distribution of reported orofacial pain in the United States. **J Am Dent Assoc**, v. 124, p. 115-21, 1994.

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.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C (T)) Method. **Methods.**, v.25, n.4, p.402-408, 2001.

LUNDEBERG T, ALSTERGREN P, APPELGREN A, APPELGREN B, CARLESON J, KOPP S, THEODORSSON E. A model for experimentally induced temporomandibular joint arthritis in rats: effects of carrageenan on neuropeptide-like immunoreactivity. **Neuropeptides**, v. 30, n. 1, p. 37–41, 1996.

MAINES, M.D. Carbon monoxide: an emerging regulatory of cGMP in the brain. **Mol. Cell Neurosci.**, v. 4, p. 389 - 397, 1993.

MAINES MD. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 37, p. 517–554, 1997.

MAINES, M. D. Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. **FASEB J** (2), 2557-2568, 1988.

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.

MARKS, G.S.; BRIEN, J.F.; NAKATSU, K.; MCLAUGHLIN, B.E. Does carbon monoxide have a physiological function? **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 12, p. 185 - 188, 1991.

MARTEL-PELLETIER, J.; ZAFARULLAH, M.; KODAMA, S.; PELLETIER, J. P. In vitro effects of interleukin 1 on the synthesis of metalloproteases, TIMP, plasminogen activators and inhibitors in human articular cartilage. **J. Rheumatol. Suppl.**, v. 27, p. 80-84, 1991.

MATSUMOTO, K.; HONDA, K.; OHSHIMA, M.; YAMAGUCHI, Y.; NAKAJIMA, I.; MICKE, P.; OTSUKA, K. Cytokine profile in synovial fluid from patients with internal derangement of the temporomandibular joint: a preliminary study. **Dentomaxillofac Radiol.**, v. 35, n. 6, p. 432-41, 2006.

MATTHEWS, B.; SESSLE, B.J. Mecanismos periféricos da dor orofacial. In: **Dor orofacial – Da ciência Básica à Conduta Clínica**. 1ª ed. Quintessence Editora, p.37-46, 2002.

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.

MCCOUBREY, W. K. Jr., HUANG, T. J.; MAINES, M. D. Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. **Eur J Biochem**, v. 247, p. 725-732, 1997.

MEGÍAS, J.; GUILLÉN, M.I.; CLÉRIGUES, V.; ROJO, A.I.; CUADRADO, A.; CASTEJÓN, M.A.; GOMAR, F.; ALCARAZ, M.J. Heme oxygenase-1 induction modulates microsomal prostaglandin E synthase-1 expression and prostaglandin E(2) production in osteoarthritic chondrocytes. **Biochem Pharmacol.**, v. 77, n. 12, p. 1806-13, 2009.

MELLER, S.T.; DYKSTRA, C.L.; GEBHART, G.F.. Investigations of the possible role for carbon monoxide (CO) in thermal and mechanical hyperalgesia in the rat. **Neuroreport**, v. 5, p. 2337–2341, 1994.

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

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.

MONJE F, DELGADO E, NAVARRO MJ, MIRALLES C, ALONSO DEL HOYO JR. Changes in temporomandibular joint after mandibular subcondylar osteotomy: an experimental study in rats. **J Oral Maxillofac Surg.**, v. 51, n. 11, p. 1221-34,1993.

MORITA, T.; PERRELLA, M.A.; LEE, M.E.; KOUREMBANAS, S. Smooth muscle cell derived carbon monoxide is a regulator of vascular cGMP. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 92, p.1475–1479, 1995.

MORO, M.A., RUSSELL, R.J., CELLEK, S., LIZASOAIN, I., SU, Y., DARLEY-USMAR, V.M., RADOMSKI, M.W. & MONCADA, S. cGMP mediates the vascular and platelet actions of nitric oxide: Confirmation using an inhibitor of the soluble guanylyl cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 93, p.1480-1485, 1996.

NASCIMENTO, C.G.O; BRANCO, L.G.S. Role of the peripheral heme oxygenase–carbon monoxide pathway on the nociceptive response of rats to the formalin test: Evidence for a cGMP signaling pathway. **Eur J Pharmacol**, v. 556, p. 55–61, 2007.

NASCIMENTO, C.G.O; BRANCO, L.G.S. Role of the spinal cord heme oxygenase–carbon monoxide–cGMP pathway in the nociceptive response of rats. **Eur J Pharmacol**, v. 581, p. 71–76, 2008.

NEEB, L.; HELLEN, P.; BOEHNKE, C.; HOFFMANN, J.; SCHUH-HOFER, S.; DIRNAGL, U.; REUTER, U. IL-1 β stimulates COX-2 dependent PGE₂ synthesis and CGRP release in rat trigeminal ganglia cells. **PLoS One.**, v. 6, n. 3, p.17360, 2011.

NISHIMURA, M.; SEGAMI, N.; KANEYAMA, K.; SATO, J.; FUJIMURA, K. Comparison of cytokine level in synovial fluid between successful and unsuccessful cases in arthrocentesis of the temporomandibular joint. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 62, p. 284-287, 2004.

NOGUCHI, M.; KUROSE, M.; YAMAMURA, K.; INOUE, M.; TAGUCHI, Y.; SESSLE, B. J.; YAMADA, Y. Unilateral application of an inflammatory irritant to the rat temporomandibular joint region produces bilateral modulation of the jaw-opening reflex. **Brain. Res. Bull.**, v. 67, n. 3, p. 182-188, 2005.

NORDAHL, S.; ALSTERGREN, P.; KOOP, S. Tumor necrosis factor-alpha in synovial fluid and plasma from patients with chronic connective tissue disease and its relation to temporomandibular joint pain. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 58, n. 5, p. 525-530, 2000.

NOZAWA-INOUE, K.; TAKAGI, R.; KOBAYASHI, T.; OHASHI, Y.; MAEDA, T. Immunocytochemical demonstration of the synovial membrane in experimentally induced arthritis of the rat temporomandibular joint. **Arch. Histol. Cytol.**, v. 61, n. 5. p. 451-466, 1998.

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.

OGURA, N.; TOBE, M.; SAKAMAKI, H.; KUJIRAOKA, H.; AKIBA, M.; ABIKO, Y.; NAGURA, H. Interleukin-1b induces interleukin-6 mRNA expression and protein production in synovial cells from human temporomandibular joint. **J Oral Pathol Med**, v. 31, p. 353–60, 2002.

OGURA, N.; TOBE, M.; SAKAMAKI, H.; NAGURA, H.; ABIKO, Y.; KONDOH, T. Tumor necrosis factor-alpha increases chemokine gene expression and production in synovial fibroblasts from human temporomandibular joint. **J Oral Pathol Med.**, v. 34, n. 6, p. 357-63, 2005.

OGURA, N.; AKUTSU, M.; TOBE, M.; SAKAMAKI, H.; ABIKO, Y.; KONDOH, T. Microarray analysis of IL-1beta-stimulated chemokine genes in synovial fibroblasts from human TMJ. **J Oral Pathol Med.**, v. 36, n. 4, p. 223-8, 2009.

ÖGÜTCEN-TOLLER., M.; KESKIN., M. Computerized 3-dimensional study of the embriologic development of the human masticatory muscle and temporomandibular joint. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 58, p. 1381-1386, 2000.

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

ONOFRE, A.N. **Dor - Princípios e Práticas**. São Paulo: Artmed, 2009.

OSHIRO S, TAKEUCHI H, MATSUMOTO M, KURATA S. Transcriptional activation of heme oxygenase-1 gene in mouse spleen, liver and kidney cells after treatment with lipopolysaccharide or hemoglobin. **Cell Biol Int**, v. 23, p. 465–474,1999.

OTTERBEIN, L.E.; BACH, F.H.; ALAM, J.; SOARES, M.; TAO LU, H.; WYSK, M. Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. **Nat Med**, v. 6, p. 422–8, 2000.

OTTERBEIN, L.E.; OTTERBEIN, S.L.; IFEDIGBO, E.; LIU, F.; MORSE, D.E.; FEARNES, C.; et al. MKK3 mitogen-activated protein kinase pathway mediates carbon monoxide-induced protection against oxidant-induced lung injury. **Am J Pathol**, v. 163, p. 2555–63, 2003.

PAE, H.O.; CHOI, B.M.; OH, G.S.; LEE, M.S.; RYU, D.G.; RHEW, H.Y.; et al. Roles of heme oxygenase-1 in the antiproliferative and antiapoptotic effects of nitric oxide on Jurkat T cells. **Mol. Pharmacol.**, v. 66, p.122–8, 2004.

PARADA, C.A.; VIVANCOS, G.G.; TAMBELI, C.H.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S. H. Activation of presynaptic NMDA receptors coupled to NaV1.8-resistant sodium channel C-fibers causes retrograde mechanical nociceptor sensitization. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, USA v.100, n.5, p.2923–2928, 2003.

PARK, S.Y.; LEE, S.W.; SHIN, H.W.; CHUNG, W.T.; LEE, W.S.; RHIM, B.Y.; HONG, K.W.; KIM, C.D. Cilostazol Enhances Apoptosis of Synovial Cells From Rheumatoid

Arthritis Patients With Inhibition of Cytokine Formation via Nrf2-Linked Heme Oxygenase 1 Induction. **Arthritis Rheumat**, v. 62, n. 3, p. 732–741, 2010.

PETRACHE, I.; OTTERBEIN, L.E.; ALAM, J.; WIEGAND, G.W.; CHOI, A.M. Heme oxygenase-1 inhibits TNF- α -induced apoptosis in cultured fibroblasts. **Am J Physiol**, v. 278, p. 312–319, 2000.

PETTIPHER, E. R.; SALTER, E. D. Resident joint tissue, rather than infiltrating neutrophil and monocytes, are the predominant sources of TNF- α in zymosan arthritis. **Cytokine**, v. 8, n. 2, p. 130-133, 1996.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res.**, v. 29, p.2002-2007, 2001.

POSS, K. D.; TONEGAWA, S. Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** (94): 10925-10930, 1997.

PUZAS, J. E. Biology and pathology of the temporomandibular joint: is there an animal model to study this affliction? **J. Musculoskel. Neuronal. Interact.**, v. 3, n. 4, p. 395-400, 2003.

QUINN, J. H.; KENT, J. N.; MOISE, A.; LUKIW, W. J. Cyclooxygenase-2 in synovial tissue and fluid of dysfunctional temporomandibular joints with internal derangements. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 58, p. 1229-1232, 2000.

QUINTEIRO, M.S.; NAPIMOGA, M.H.; MESQUITA, K.P.; CLEMENTE-NAPIMOGA, J.T. The indirect antinociceptive mechanism of 15d-PGJ(2) on rheumatoid arthritis-induced TMJ inflammatory pain in rats. *Eur J Pain.*, 2012, doi: 10.1002/j.1532-2149.2012.00114.x. [Epub ahead of print].

RAO, T. S.; CURRIE, J. L.; SHAFTER, A. F.; ISAKSON, P. C. In vivo characterization of zymosan-induced mouse peritoneal inflammation. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 269, n. 3, p. 917-925, 1994.

RATCLIFF, A.; ISRAEL, H. A.; SAED-NEJAD, F.; DIAMOND, B. Proteoglycans in the synovial fluid of the temporomandibular joint as an indicator of changes in cartilage metabolism during primary and secondary osteoarthritis. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 56, n. 2, p. 204-208, 1998.

REN, K. An improved method for assessing mechanical allodynia in the rat. **Physiol. Behav.**, v. 67, n. 5, p. 711-716, 1999.

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

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.

RODRIGUES LL, OLIVEIRA MC, PELEGRINI-DA-SILVA A, DE ARRUDA VEIGA MC, PARADA CA, TAMBELI CH. Peripheral sympathetic component of the temporomandibular joint inflammatory pain in rats. **J Pain.**, v. 7(12), p. :929-36, 2006.

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

SACHS, D.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. Peripheral analgesic blockade of hypernociception: activation of arginine/NO/cGMP/protein kinase G/ATP-sensitive K⁺ channel pathway. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 101, n. 10, p. 3680-3685, 2004.

SANDLER, N. A.; BUCKLEY, M. J.; CILLO, J. E.; BRAUN, T. W. Correlation of inflammatory cytokines with arthroscopic findings in patients with temporomandibular joint internal derangements. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 56, n. 5, p. 534-543, 1998.

SASAKI, K.; HATTORI, T.; FUJISAWA, T.; TAKAHASHI, K.; INOUE, H.; TAKIGAWA, M. Nitric oxide mediates interleukin-1-induced gene expression of matrix metalloproteinases and basic fibroblast growth factor in cultured rabbit articular chondrocytes. **J. Biochem.**, v. 123, n. 3, p. 431-439, 1998.

SATOH, K.; OGURA, N.; AKUTSU, M.; KUBOYAMA, N.; KUYAMA, K.; YAMAMOTO, H.; KONDOH, T. Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in IL-1beta-induced synovitis of the temporomandibular joint. **J Oral Pathol Med.**, v. 38, n. 7, p. 584-90, 2009.

SCHMITTGEN, T.D.; ZAKRAJSEK, B.A.; MILLS, A.G.; GORN, V.; SINGER, M.J.E.; REED, M.W. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods. **Anal Biochem**, v.285, n.2, p.194-204, 2000.

SESSLE, B.J. Neural mechanism and pathways in craniofacial pain. **Can J Neurol**, v.26, p.3-11, 1999.

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, p.57-91, 2000.

SESSLE, B.J. Trigeminal central sensitization. **Rev Analg**, v. 8, p. 85–102, 2005a.

SESSLE, B.J. Peripheral and central mechanisms of orofacial pain and their clinical correlates. **Minerva Anesthesiol**, v. 71, p.117–36, 2005b.

SESSLE, B.J.; HU, J.W. Mechanisms of pain arising from articular tissues. **J Physiol Pharmacol**, v.69, p. 617-626, 1991.

SESSLE, B.J.; HU, J.W.; AMANO, N.; ZHONG, G. Convergence of cutaneous, tooth pulp, visceral, neck and muscle afferents onto nociceptive and non-nociceptive

neurones in trigeminal subnucleus caudalis (medullary dorsal horn) and its implications for referred pain. **Pain**, v. 27, n. 2, p. 219-35, 1986.

SHAFER, D.M.; ASSAEL, L.; WHITE, L.B.; ROSSOMANDO, E.F. Tumor necrosis factor-alpha as a biochemical marker of pain and outcome in temporomandibular joints with internal derangements. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 52, n. 8, p. 786-791, 1994.

SHIBATA, T.; MURAMAKI, K.; KUBOTA, E.; MAEDA, H. Glycosaminoglycan components in temporomandibular joint synovial fluid as markers of joint pathology. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 56, n. 2, p. 209-213, 1998.

SHIMODA, T. [An experimental study on change on the contralateral Temporomandibular joint after unilateral condylectomy on one of the bilateral joints]. **Fukuoka Shika Daigaku Gakkai Zasshi.**, v. 16, n. 2, p. 249-81, 1989.

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

SHINODA, C.; TAKAKU, S. Interleukin-1 β , 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.

SIQUEIRA, JTT; TEIXEIRA, MJ. **Dores orofaciais - diagnóstico e tratamento**. São Paulo: Artes Médicas, 2012.

SJOSTRAND, T. Endogenous formation of carbon monoxide in man under normal and pathological conditions. **J. Clin. Lab. Invest.**, v.1, p. 201 - 210, 1949.

SMYTHE, H. A. Temporomandibular joint disorder and other medically unexplained symptoms in rheumatoid arthritis, osteoarthritis, and fibromyalgia. **J. Rheumatol.**, v. 32, n; 12, p. 2288-2290, 2005.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CEFALÉIA (SBC). **Dores Orofaciais e Disfunção Têmporo-Mandibular**, 2010. Disponível em: <http://www.sbce.med.br/artigos/193-dores-orofaciais-disfuncao-temporo-mandibular>. Acesso em: 24 de out. 2011.

SPEARS, R.; OAKES, R.; MOORE, C.; BELLINGER, L.L.; HUTCHINS, B. A determination of tumor necrosis factor expression in TMJ inflammation with the use of microarray analysis. **J Dent Res.**, v. 82, n. 10, p. 807-13, 2003.

SPEARS, R.; DEES, L.A.; SAPOZHNIKOV, M.; BELLINGER, L.L.; HUTCHINS, B. Temporal changes in inflammatory mediator concentrations in an adjuvant model of temporomandibular joint inflammation. **J. Orofac. Pain.**, v. 19, n. 1, p. 34-40, 2005.

STEINER, A.A.; BRANCO, L.G.S.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. Role of the haeme oxygenase/carbon monoxide pathway in mechanical nociceptor hypersensitivity. **Brit J Pharmacol**, v. 132, p. 1673 - 1682, 2001.

SUKEDAI, M.; TOMINAGA, K.; HABU, M.; MATSUKAWA, A.; NISHIHARA, T.; FUKUDA J. Involvement of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-8 in antigen-induced arthritis of the rabbit temporomandibular joint. **J. Oral Pathol. Med.**, v.33, n. 2, p. 102-110, 2004.

SUZUKI, T.; SEGAMI, N.; NISHIMURA, M.; NOJIMA, T. Co-expression of interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha in synovial tissues and synovial fluids of temporomandibular joint with internal derangement: comparison with histological grading of synovial inflammation. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 31, n. 9, p. 549-57, 2002.

TAKAHASHI, A.; MORI, M.; NARUTO, T.; NAKAJIMA, S.; MIYAMAE, T.; IMAGAWA, T.; YOKOTA. S. The role of heme oxygenase-1 in systemic-onset juvenile idiopathic arthritis. **Mod Rheumatol.**, v. 19, n. 3, p. 302-8, 2009.

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. **Neuroscience**, v. 138, n. 2, p. 621-630, 2006.

TAKEDA, M.; TANIMOTO, T.; KADOI, J.; NASU, M.; TAKAHASHI, M.; KITAGAWA, J.; MATSUMOTO, S. Enhanced excitability of nociceptive trigeminal ganglion neurons by satellite glial cytokine following peripheral inflammation. **Pain**, v. 129, n. 1-2, p. 155-66, 2007.

TAKEDA, M.; TAKAHASHI, M.; MATSUMOTO, S. Contribution of activated interleukin receptors in trigeminal ganglion neurons to hyperalgesia via satellite glial interleukin-1beta paracrine mechanism. **Brain Behav Immun.**, v. 22, n. 7, p.1016-23, 2008.

TAKEDA, M.; KITAGAWA, J.; TAKAHASHI, M.; MATSUMOTO, S. Activation of interleukin-1beta receptor suppresses the voltage-gated potassium currents in the small-diameter trigeminal ganglion neurons following peripheral inflammation. **Pain.**, v. 139, n. 3, p. 594-602, 2008.

TAKEUCHI, Y.; ZEREDO, 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.

TATAKIS, D. N. Interleukin-1 and bone metabolism: a review. **J. Periodontol.**, v. 64, p. 416-431, 1993.

TEIXEIRA JM, OLIVEIRA MC, PARADA CA, TAMBELI CH. Peripheral mechanisms underlying the essential role of P2X7 receptors in the development of inflammatory hyperalgesia. **Eur J Pharmacol.**, v. 644(1-3), p. 55-60, 2010a.

TEIXEIRA JM, OLIVEIRA MC, NOCITI FH JR, CLEMENTE-NAPIMOGA JT, PELEGRINI-DA-SILVA A, PARADA CA, TAMBELI CH. Involvement of temporomandibular joint P2X3 and P2X2/3 receptors in carrageenan-induced inflammatory hyperalgesia in rats. **Eur J Pharmacol.**, v. 645(1-3), p. :79-85, 2010b.

TENHUNEN, R.; MARVER, H.S.; SCMID, R. Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme. **J Biol Chem** (244): 6388–6394, 1969.

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

TOBE, M.; OGURA, N.; ABIKO, Y.; NAGURA, H. Interleukin-1b stimulates interleukin-8 production and gene expression in synovial cells from human temporomandibular joint. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 60, p. 741–7, 2002.

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, 1999a.

TOMINAGA, K.; ALSTERGREN, P.; KURITA, H.; MATSUKAWA, A.; FUKUDA, J.; KOPP, S. Interleukin-1beta in antigen-induced arthritis of the rabbit temporomandibular joint. **Arch Oral Biol.**, v. 46, n. 6, p. 539- 44, 2001.

TOMINAGA, K.; HABU, M.; SUKEDAI. M.; HIROTA, Y.; TAKAHASHI, T.; FUKUDA, J. IL-1 β , IL-1 receptor antagonist and soluble type II IL-1 receptor in synovial fluid of patients with temporomandibular disorders. **Arch. Oral Biol.**, v. 49, p. 493-499, 2004.

TOMINAGA K, HIRASHIMA S, FUKUDA J. An experimental model of osteoarthritis of the temporomandibular joint in monkeys. **Br J Oral Maxillofac Surg.**, v. 40, n. 3, p. 232-7, 2002.

TRAKSHEL, G.M.; KUTTY, R.K.; MAINES, M.D. Purification and characterization of the major constitutive form of testicular heme oxygenase. The noninducible isoform. **J. Biol. Chem** (261): 11131-7, 1986.

UDDMAN, R.; TAJTI, J.; SUNDLER, F.; CARDELL, L.O. The presence of heme-oxygenase and biliverdin reductase in human cranial ganglia indicates a role for carbon monoxide in neural transmission. **Neuro Endocrinol Lett.**, v. 25, n. 6, p. 423-8, 2004.

UEHARA, J.; KUBOKI, T.; FUJISAWA, T.; KOJIMA, S.; MAEKAWA, K.; YATANI, H. Soluble tumor necrosis factor receptors in synovial fluids from temporomandibular joints with painful anterior disc displacement without reduction and osteoarthritis. **Arch. Oral Biol.**, v. 49, p. 133-142, 2004.

VACHHARAJANI, T. J.; WORK, J.; ISSEKUTZ, A. C. and GRANGER, D. N. Heme oxygenase modulates selectin expression in different regional vascular beds. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 278, p. 1613-1617, 2000.

IVANEGAS, H.; SCHAIBLE, H.G. Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory? **Brain Res Rev.** v.46, n.3, p.295-309, 2004.

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. Pharmacol.**, v. 536, n. 3, p. 309-317, 2006 .

VALVASON, C.; MUSACCHIO, E.; POZZUOLI, A.; RAMONDA, R.; ALDEGHER, R.; PUNZI, L. Influence of glucosamine sulphate on oxidative stress in human osteoarthritic chondrocytes: effects on HO-1, p22Phox and iNOS expression. **Rheumatology**, v. 47, p. 31–35, 2008.

VAUDO G.; MARCHESI, S.; GERLI, R.; ALLEGRUCCI, R.; GIORDANO, A.; SIEPI, D.; PIRRO, M.; SHOENFELD, Y.; SCHILLACI, G.; MANNARINO, E. Endothelial dysfunction in young patients with rheumatoid arthritis and low disease activity”, **Ann Rheum Dis**, vol. 63, pp. 31-35, 2004.

VERNAL, R.; VELÁSQUEZ, E.; GAMONAL, J.; GARCIA-SANZ, J.A.; SILVA, A.; SANZ, M. Expression of proinflammatory cytokines in osteoarthritis of the temporomandibular joint. **Arch Oral Biol.**, v. 53, n. 10, p. 910-5, 2008.

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 Pharmacol Exp Ther**, v. 307, p. 1030–1037, 2003.

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. **Pain**, v. 6, n. 89, 14 p, 2010.

WAGENER, F.A.; TOONEN, E.J.; WIGMAN, L.; FRANSEN, J.; CREEMERS, M.C.; RADSTAKE, T.R.; COENEN, M.J.; BARRERA, P.; VAN RIEL, P.L.; RUSSEL, F.G. HMOX1 promoter polymorphism modulates the relationship between disease activity and joint damage in rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.**, v. 58, n. 11, p. 3388-93, 2008.

WATKINS, L. R.; WIERTELAK, E. P.; GOEHLER, L. E.; SMITH, K. P.; MARTIN, D.; MAIER, S. F. Characterization of cytokine-induced hyperalgesia. **Brain Res.**, v. 654, n. 1, p. 15-26, 1994.

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.

WRUCK, C.J; FRAGOULIS, A.; GURZYNSKI, A.; BRANDENBURG, L.O.; KAN, Y.W.; CHAN, K.; HASSENPFUG, J.; FREITAG-WOLF, S.; VAROGA. D.; LIPPROSS, S.; PUFE, T. Role of oxidative stress in rheumatoid arthritis: insights from the Nrf2-knockout mice. **Ann Rheum Dis.**, v. 70, n. 5, p. 844-50, 2011.

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)**, 228: 550-556, 2003.

YAILLEN, D. M.; SHAPIRO, P. A.; LUSCHEI, E. S.; FELDMAN, G. R. Temporomandibular joint meniscectomy – Effect on joint structure and masticatory function in *Macaca Fascicularis*. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 7, p. 255-230, 1979.

YAMAZA, T.; MASUDA, K. F.; TSUKIYAMA, Y.; NISHIJIMA, K.; MURAKAMI, R.; KIDO, M. A.; KOYANO, K.; TANAKA, T. NF-kappaB activation and iNOS expression in the synovial membrane of rat temporomandibular joints after induced synovitis. **J. Dent. Res.**, v. 82, n. 3, p. 183-188, 2003.

YATANI, H.; STUDTS, J.; CORDOVA, M.; CARLSON, C. R.; OKESON, J. P. Comparison of sleep quality and clinical and psychologic characteristics in patients with temporomandibular disorders. **J. Orofac. Pain**, v. 16, n. 3, p. 221-228, 2002.

YU, X. M.; SESSLE, B. J.; VERNON, H.; HU, J. W. Effects of inflammatory irritant application to the rat temporomandibular joint on jaw and neck muscle activity. **Pain**, v. 60, n. 2, p. 143-149, 1995.

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

ANEXO 1

Trabalho completo publicado em periódico indexado.

Grangeiro NMG, Aguiar JA, Chaves HV, Silva AAR, Lima V, Benevides NMB, Brito GAC, Graça JRV, Bezerra MM. Heme oxygenase/carbon monoxide-biliverdin pathway may be involved in the antinociceptive activity of etoricoxib, a selective COX-2 inhibitor. *Pharmacological reports* 2011;63:112-119.

ANEXO 2

Trabalho completo publicado em periódico indexado.

Chaves HV, Ribeiro RA, Souza AMB, Silva AAR, Gomes AS, Val ML, Bezerra MM, Brito GAC.

Experimental model of zymosan-induced arthritis in the rat temporomandibular joint: role of nitric oxide and neutrophils. J Biomed Biotech 2011;2011:ID 707985,11 pages.

ANEXO 3

Trabalho completo a ser enviado para publicação em periódico indexado.

Chaves HV, Val DR, Ribeiro KA, Filgueiras AA, Silva AAR, Teixeira VP, Souza MH, Ribeiro RA, Bezerra MM, Brito GAC. Heme oxygenase/carbon monoxide-biliverdin pathway is involved in the temporomandibular joint arthritis and facial hypernociception. *Arthritis Rheum.*

ANEXO 4

Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa Animal