



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CAMPUS DE SOBRAL**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA - PPGB**

**RAUL SOUSA FREITAS**

**EFICÁCIA ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DE LECTINA DE**  
***Abelmoschus esculentus* NO MODELO DE HIPERNOCICEPÇÃO**  
**INFLAMATÓRIA INDUZIDA POR ZYMOSAN NA ARTICULAÇÃO**  
**TEMPOROMANDIBULAR DE RATOS**

**SOBRAL - CE**

**2015**

**RAUL SOUSA FREITAS**

**EFICÁCIA ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DE LECTINA DE  
*Abelmoschus esculentus* NO MODELO DE HIPERNOCICEPÇÃO  
INFLAMATÓRIA INDUZIDA POR ZYMOSAN NA ARTICULAÇÃO  
TEMPOROMANDIBULAR DE RATOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará – *Campus* de Sobral, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.  
Área de concentração: Macromoléculas.

Orientador: Prof. Dr. Gerardo Cristino Filho.  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Hellíada Vasconcelos Chaves.

**SOBRAL - CE**

**2015**

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

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

---

F938e Freitas, Raul Sousa.  
EFICÁCIA ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DE LECTINA DE *Abelmoschus  
esculentus* NO MODELO DE HIPERNOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA INDUZIDA POR  
ZYMOSAN NA ARTICULAÇÃO TEMPOROMANDIBULAR DE RATOS / Raul Sousa Freitas.  
– 2015.  
87 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Campus de Sobral, Programa  
de Pós-Graduação em Biotecnologia, Sobral, 2015.

Orientação: Prof. Dr. Gerardo Cristino Filho.

Coorientação: Profa. Dra. Heliada Vasconcelos Chaves.

1. Lectina. 2. Inflamação. 3. Mediação da dor. 4. Zymosan. I. Título.

---

CDD 680.6

**RAUL SOUSA FREITAS**

**EFICÁCIA ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DE LECTINA DE  
*Abelmoschus esculentus* NO MODELO DE HIPERNOCICEPÇÃO  
INFLAMATÓRIA INDUZIDA POR ZYMOZAN NA ARTICULAÇÃO  
TEMPOROMANDIBULAR DE RATOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará – *Campus* de Sobral, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Macromoléculas

Aprovada em: 06/02/2015

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Gerardo Cristino Filho (Orientador)

Universidade Federal do Ceará (UFC) - *Campus* Sobral

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Hellíada Vasconcelos Chaves (Co-orientadora)

Universidade Federal do Ceará (UFC) - *Campus* Sobral

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mirna Marques Bezerra

Universidade Federal do Ceará (UFC) – *Campus* Sobral

*Aos meus pais, em especial minha mãe*

*Arleide Freitas.*

*Com amor, dedico.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus por ter tornado tudo isso possível. Por me guiar e me fortalecer nos momentos difíceis, sem o qual nada faria sentido.

À minha co-orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Hellíada Vasconcelos Chaves, peça chave na execução desse projeto. Agradeço por toda a orientação, paciência, pela boa vontade e humildade em juntar-se a mim na bancada durante a execução dos experimentos para realizar a indução da hipernocicepção inflamatória nos animais. Meu muito obrigado por todos os ensinamentos e conhecimento científico compartilhado durante todo o meu mestrado.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Mirna Marques Bezerra, por toda orientação, suporte e incentivo recebido. Agradeço por ter me recebido no Laboratório de Farmacologia de Sobral – LaFS com tamanha gentileza e simplicidade. Obrigado por todo auxílio, sugestões e correções fundamentais para a execução desse projeto.

Ao meu orientador Prof. Dr. Gerardo Cristino Filho pela confiança e oportunidade.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Tatiane Santi-Gadelha, Prof. Dr. Carlos Alberto Gadelha e ao pós-graduando José Thales de Lacerda da Universidade Federal da Paraíba por gentilmente cederem a lectina de *Abelmoschus esculentus*, ferramenta farmacológica sem a qual esse estudo não poderia ter sido realizado.

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

Ao técnico do laboratório de histologia da UFC Júnior Lima pela dedicação, competência e trabalho com o processamento histológico.

Ao Núcleo de Estudos em Microscopia e Processamento de Imagem – NEMPI por permitir a realização das fotografias das lâminas histológicas.

Aos alunos de iniciação científica Maria Ester Frota e Thyago Vieira que me acompanharam durante esse projeto de mestrado e me auxiliaram na execução dos experimentos. Obrigado pela valiosa e indispensável contribuição para a realização desse projeto.

Aos amigos do Laboratório de Farmacologia de Sobral/LaFS, em especial, Danielle do Val, Jordânia Marques, Kátia Alves (Kate), José Mário Pachêco, Sheila Alves, Shirley Alves, Lorena Vieira, Elen Lima, Alrieta Teixeira. Agradeço por toda ajuda, companheirismo, amizade e incentivo.

À minha estimada amiga companheira de laboratório e turma de mestrado Isabela Ribeiro Pinto, amiga de todas as horas durante essa árdua e desafiadora jornada chamada Pós-Graduação. Agradeço pela amizade, compartilhamento de experiências, conversas, conselhos e por estar sempre presente e disposta a ajudar quando precisei.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Ianna Wivianne Fernandes de Araújo pela atenção, disponibilidade, boa vontade e generosa ajuda quando eu muito necessitava para a realização do primeiro experimento desse projeto.

Aos meus colegas e amigos da 6<sup>a</sup> turma de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UFC Sobral pela engrandecedora convivência. Que o nosso conhecimento não seja obstáculo à humildade, pois o desejo de ter sempre razão é o maior empecilho para novas ideias.

Aos órgãos financiadores Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), pelo apoio financeiro para as pesquisas e pela bolsa de estudos concedida.

À Universidade Federal do Ceará (UFC) – Campus Sobral, e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, pela oportunidade de realização de um Curso de Mestrado.

À todos os professores que compõem o corpo docente do programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UFC Sobral, por todos os ensinamentos, conhecimento repassado e por facilitarem nosso aprendizado. Obrigado pela rica e importante contribuição na minha formação profissional/acadêmica e pessoal.

À todo o quadro de funcionários da Universidade Federal do Ceará – UFC *Campus* Sobral, na pessoa do Sr. Almino. Agradeço pelo profissionalismo, disponibilidade, apoio técnico e prestação de serviço.

Aos meus pais pela oportunidade, apoio e admiração. Em especial à minha mãe Arleide Freitas. Te agradeço pela paciência e compreensão durante essa minha longa caminhada. Um muito obrigado é pouco para exprimir a gratidão e emoção que sinto agora, uma emoção que jamais seria traduzida em palavras. À você todo meu amor e eterna gratidão.

Ao meu irmão Artur Freitas pelo incentivo, amizade e apoio em todos os momentos.

Aos amigos Marcos Levy Machado, Diego César Tavares, Aldenir Rocha, Diego Frade, Rennan Mendes e Amaury Ponte pela amizade, momentos de descontração, companheirismo, torcida e apoio.

Aos que acreditaram em mim, torceram pelo meu sucesso e que de alguma forma me ajudaram na realização desse trabalho e conquista desse título. Com vocês divido o mérito dessa vitória. Recebam o meu muito obrigado!



*“Se consegui enxergar mais longe, foi porque me apoiei sobre os ombros de gigantes.”*

*Isaac Newton*

## RESUMO

A artrite na articulação temporomandibular se apresenta como um dos diagnósticos diferenciais nas disfunções temporomandibulares e, apesar de ser uma importante condição clínica, seus mecanismos ainda não são completamente compreendidos. O quiabeiro (*Abelmoschus esculentus* Moench.) além de ser utilizado na alimentação, também é utilizado em medicina nos casos de pneumonia, bronquites e tuberculose pulmonar, atuando também como laxante. Alguns autores sugerem que os testes de atividade biológica da lectina da farinha de sementes, previamente purificada, apresentaram atividade anti-inflamatória e antinociceptiva. O objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória da lectina de *Abelmoschus esculentus* (AEL) no modelo de hipernocicepção inflamatória induzida por zymosan (Zy) na articulação temporomandibular (ATM) de ratos. Ratos Wistar machos (180-240g) foram pré-tratados (i.v.) com AEL (0,01, 0,1 ou 1 mg/kg) 30 min antes da injeção intra-articular (i.art.) de Zy (2mg) ou salina (grupo sham) na ATM esquerda. Grupos controles receberam salina estéril (40 µL; i.art.) ou indometacina (5 mg/kg; s.c). Para analisar o envolvimento da via da HO-1 no efeito antinociceptivo e anti-inflamatório mediado por AEL, os animais foram pré-tratados (3 mg/kg, s.c.) com um inibidor específico da enzima hemeoxigenase 1 (HO-1) (zinco protoporfirina IX – ZnPP-IX) e para investigar o envolvimento da via do óxido nítrico, animais foram pré-tratados (aminoguanidina 30 mg/kg, i.p.) com um inibidor seletivo para a enzima óxido nítrico sintetase induzível (iNOS). O efeito antinociceptivo foi avaliado pelo teste de Von Frey na 4<sup>h</sup> após a injeção de Zy. Na 6<sup>h</sup> após a injeção i. art. de Zy, os animais foram submetidos a eutanásia, sendo removido tecido periarticular e gânglio trigeminal (GT), para dosagem de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  pelo método ELISA e coletado o lavado sinovial, para contagem total de leucócitos e avaliação da atividade de mieloperoxidase (MPO). Também foi removida a ATM para análise histopatológica (H&E) e imunohistoquímica para TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e HO-1. Em uma outra sequência de experimentos, seguiu-se AEL prévio ao Zy e, 30 min antes da eutanásia, Azul de Evans (5mg/kg, .i.v.) foi administrado para avaliar extravasamento plasmático. Observou-se que AEL nas doses de 0,01, 0,1 e 1 mg/kg aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) o limiar de hipernocicepção inflamatória comparado ao grupo Zy. AEL (1mg/kg) reduziu significativamente ( $p < 0,05$ ) os níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no tecido periarticular e no GT quando comparado ao grupo Zy,

sendo semelhante ( $p < 0,05$ ) ao grupo sham. AEL 1 mg/kg reduziu consideravelmente ( $p < 0,05$ ) o influxo celular, a atividade de MPO, o infiltrado celular inflamatório na membrana sinovial da ATM e o extravasamento plasmático quando comparado ao grupo Zy. AEL também foi capaz de aumentar a imunomarcagem de HO-1 e diminuir a expressão de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  na membrana sinovial da ATM. Os efeitos de AEL não foram observados quando na presença de ZnPP-IX. A Lectina de *Abelmoschus esculentus* reduz a hipernocicepção inflamatória na ATM de ratos induzida por zymosan e seus efeitos parecem depender da redução dos níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  e da integridade da via da HO-1.

**Palavras-chave:** *Abelmoschus esculentus*, articulação temporomandibular, hipernocicepção, HO-1, lectina.

## ABSTRACT

*Abelmoschus esculentus* (Okra), an African plant cultivated in northeastern Brazil, is used for different medicinal purposes. Here we investigated *Abelmoschus esculentus* lectin (AEL) efficacy in zymosan-induced temporomandibular joint (TMJ) inflammatory hypernociception in rats. Rats were pretreated with AEL (0.01, 0.1 or 1 mg/kg) before zymosan (Zy) injection in the TMJ. Further, rats were pretreated with ZnPP-IX (3 mg/kg), a specific HO-1 inhibitor, or aminoguanidine (30mg/kg), a selective iNOS inhibitor, before AEL. Von Frey test was used to evaluate hypernociception. 6 h after Zy synovial fluid was collected for leukocyte counting and myeloperoxidase (MPO) activity; and TMJ tissue for histopathological analysis (H&E) and immunohistochemistry for TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and HO-1. Vascular permeability was evaluated by Evans Blue extravasation. Also, TMJ tissue and trigeminal ganglion were removed for TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  dosage (ELISA). AEL increased nociceptive threshold. AEL reduced cell influx, MPO activity, cell influx in synovial membrane, and Evans Blue extravasation. AEL increased HO-1 expression while decreased both TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  expression. AEL effects were not observed in the presence of ZnPP-IX. AEL reduced TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  levels in both TMJ tissue and trigeminal ganglion. AEL efficacy in zymosan-induced TMJ inflammatory hypernociception in rats depends on TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  inhibition and HO-1 pathway integrity.

**Keywords:** *Abelmoschus esculentus*, temporomandibular joint, hypernociception, HO-1 pathway, lectin.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1. - FIGURE 1. Efficacy of *Abelmoschus esculentus lectin* on zymosan-induced TMJ inflammatory hypernociception (means  $\pm$  SD). (A) Head withdrawal threshold, (B) Leukocyte counting. (C) MPO activity and (D) Evans Blue extravasation.....49
- FIGURA 2. - FIGURE 2. Photomicrographs of the histopathological analysis of TMJs (400 $\times$ ): (A) sham group TMJ (B) TMJ inflammatory hypernociception on zymosan-induced. (C) TMJ of rats pretreated with AEL (1 mg/kg) and (D) TMJ of rats pretreated with ZnPP-IX (3 mg/kg) and AEL (1 mg/kg) .....51
- FIGURA 3. - FIGURE 3. Effect of *Abelmoschus esculentus lectin* on the levels of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in the TMJ periarticular tissue (A) and (C) and in the trigeminal ganglion (B) and (D) on zymosan-induced TMJ inflammatory hypernociception.....53
- FIGURA 4 - FIGURE 4. Effect of zinc protoporphyrin IX (ZnPP-IX) on the *Abelmoschus esculentus lectin* efficacy in zymosan-induced TMJ inflammatory hypernociception: (A) Head withdrawal threshold in ZnPP-IX + AEL-treated animals. (B) Leukocyte counting of ZnPP-IX + AEL-treated animals. (C) Myeloperoxidase (MPO) activity from TMJ synovial lavage of ZnPP-IX + AEL-treated animals.....54
- FIGURA 5. – FIGURE 5. Effects of aminoguanidine on the *Abelmoschus esculentus lectin* efficacy in zymosan-induced TMJ inflammatory hypernociception. (A) Head withdrawal threshold of aminoguanidine + AEL-treated animals. (B) Leukocyte counting in aminoguanidine + AEL-treated animals. (C) Myeloperoxidase (MPO) activity from TMJ synovial lavage in aminoguanidine + AEL-treated animals.....56
- FIGURA 6. – FIGURE 6. Immunohistochemistry analysis for TNF- $\alpha$  in zymosan-induced rat TMJ inflammatory hypernociception (400 $\times$ ): (A) Negative control sections from zymosan groups. (B) The synovial membrane from the sham group

(C) The synovial membrane from the zymosan group (D) The sinovial membrane from AEL-treated (1 mg/kg, i.v.) group .....58

FIGURA 7. – FIGURE 7 Immunohistochemistry analysis for IL-1 $\beta$  in zymosan-induced rat TMJ inflammatory hypernociception (400 $\times$ ): (A) Negative control sections from zymosan group (B) The synovial membrane from sham group (C) The synovial membrane from zymosan group. (D) Sinovial membrane from AEL-treated group (1 mg/kg, i.v.) .....59

FIGURA 8. – FIGURE 8 Immunohistochemistry analysis for HO-1 in zymosan-induced rat TMJ inflammatory hypernociception (400 $\times$ ): (A) Negative control sections from zymosan group. (B) Synovial membrane from sham group. (C) Synovial membrane from zymosan group. (D) Sinovial membrane from AEL-treated group (1 mg/kg, i.v.) .....60

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1. – TABLE 1 Histopathological analysis of the temporomandibular joint in zymosan-induced inflammatory hypernociception: The effect of <i>Abelmoschus esculentus</i> lectin and its effect in the presence of ZnPP-XI.....	52
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>DAINEs</b>	Dogras Anti-inflamatórias Não-esteroidais
<b>ANOVA</b>	Análise de Variância
<b>TMJ</b>	Temporomandibular Joint
<b>ATM</b>	Articulação Temporomandibular
<b>HO-1</b>	Hemeoxigenase 1
<b>iNOS</b>	Óxido Nítrico Sintetaze Induzível
<b>GMP<sub>c</sub></b>	Guanilato Monofosfato Cíclico
<b>BVD</b>	Biliverdina
<b>CEPA</b>	Comissão de Ética em Pesquisa Animal
<b>CO</b>	Monóxido de Carbone
<b>COX</b>	Ciclooxigenase
<b>NF-κB</b>	Fator Nuclear Kappa B
<b>DTM</b>	Disfunção Temporomandibular
<b>EDTA</b>	Ácido Etilenoaminotetracético
<b>E.P.M.</b>	Erro Padrão da Média
<b>IL-8</b>	Interleucina 8
<b>HCl</b>	Ácido Clorídrico
<b>HE</b>	Hematoxilina-Eosina
<b>HO-1</b>	Heme oxigenase-1
<b>IASP</b>	Associação Internacional para o Estudo da Dor
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IL- 1β</b>	Interleucina 1-beta
<b>i.art.</b>	Intra-articular
<b>i.p.</b>	Intraperitoneal
<b>i.v.</b>	Intravenosa
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeo
<b>AEL</b>	<i>Abelmoschus esculentus</i> Lectin
<b>μg</b>	Micrograma
<b>μL</b>	Microlitro
<b>MPO</b>	Mieloperoxidase
<b>nm</b>	Nanômetro



<b>NMDA</b>	N-metil D-Aspartato
<b>NO</b>	Óxido Nítrico
<b>NOS</b>	Óxido Nítrico Sintase
<b>PMNS</b>	Polimorfonucleares
<b>PGE</b>	Prostaglandina E 2
<b>PBS</b>	Tampão Fosfato
<b>PG</b>	Prostaglandina
<b>PGI<sub>2</sub></b>	Prostaciclina
<b>pH</b>	Potencial Hidrogeniônico
<b>s.c.</b>	Subcutânea
<b>AR</b>	Artrite Reumatóide
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon Gama
<b>OA</b>	Osteoartrite
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de Necrose Tumoral Alfa
<b>NOS<sub>c</sub></b>	Óxido Nítrico Sintetase Constitutiva
<b>ZnPP IX</b>	Zinco Protoporfirina IX
<b>Zy</b>	Zymosan

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	19
1.1 Dor orofacial e disfunções temporomandibulares .....	19
1.2 Hipernocicepção inflamatória induzida por zymosan .....	31
1.3 Lectina de <i>Abelmoschus esculentus</i> .....	32
<b>2. HIPÓTESES</b> .....	35
<b>3. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA</b> .....	36
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	37
4.1 Geral .....	37
4.2 Específicos .....	37
<b>5. CAPÍTULO I - ARTIGO:</b> Lectin from <i>Abelmoschus esculentus</i> reduces zymosan-induced temporomandibular joint inflammatory hypernociception in rats via heme oxygenase-1 pathway integrity and TNF- $\alpha$ and IL-1 $\beta$ suppression .....	38
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	73
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	74
<b>8. REFERÊNCIAS</b> .....	75

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1 Dor Orofacial e Disfunções Temporomandibulares**

A artrite na articulação temporomandibular (ATM) se apresenta como um dos diagnósticos diferenciais nas disfunções temporomandibulares (DTM) que, por sua vez, engloba um grupo de condições musculoesqueléticas e neuromusculares envolvendo as ATMs, os músculos mastigatórios e todos os tecidos associados. Os sinais e sintomas associados com essas disfunções são diversos e podem incluir: dificuldade em mastigar, falar, e outras funções orofaciais, estando frequentemente associadas com dor persistente. As formas crônicas das DTM são extremamente incapacitantes, podendo acarretar afastamento ou incapacidade nas atividades laborais e/ou sociais, resultando em diminuição da qualidade de vida dos seus pacientes (AMERICAN ASSOCIATION FOR DENTAL RESEARCH, 2010).

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

A dor orofacial, por sua vez, é descrita como 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, cefaléias secundárias, neuropatias, dores odontogênicas e advindas da mucosa oral e dor facial idiopática (SHINAL; FILLINGIM, 2007). As características comuns de tais condições são a hiperalgesia mecânica primária ou hipersensibilidade no local da lesão e a hiperalgesia mecânica secundária, assim como pode ocorrer alodinia (SHIBUTA et al, 2012).

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 boa parte da população mundial com 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 dessa importância, se faz mister o aprofundamento no estudo da fisiopatologia da dor orofacial na perspectiva de diagnóstico mais acurado e de terapêuticas mais eficazes.

Dor nas estruturas articulares e musculares é um dos mais importantes sintomas de pacientes com DTM e uma fonte comum de dor orofacial crônica. A artrite na articulação temporomandibular (ATM) se apresenta como um dos diagnósticos diferenciais nas disfunções temporomandibulares (DTM) que, por sua vez, engloba um grupo de condições musculoesqueléticas e neuromusculares envolvendo as ATMs, os músculos mastigatórios e todos os tecidos associados. Os sinais e sintomas associados com essas disfunções são diversos, estando frequentemente associadas com dor aguda ou persistente. As formas crônicas das DTMs são extremamente incapacitantes, podendo acarretar afastamento ou incapacidade nas atividades laborais e /ou sociais, resultando em diminuição da qualidade de vida dos seus pacientes (GREENE et al., 2010). No entanto, o papel das citocinas e moduladores das vias da heme-oxigenase e do óxido nítrico na fisiopatologia inflamatória em articulação temporomandibular ainda não foi completamente elucidado.

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 (YU et al., 1995; SESSLE, 2002; 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., 2005; 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).

A despeito dos achados clínicos, a caracterização dos mecanismos celulares e moleculares que formam a base da dor orofacial advinda da ATM, assim como seu diagnóstico e tratamento, ainda carece de maior estudo. Neste sentido, estratégias que busquem a elucidação da fisiopatologia das DTMs, através do desenvolvimento de ferramentas que possam afetar seu curso evolutivo, contribuirão sobremaneira para a melhoria da qualidade de vida dos pacientes.

Considerando-se o caráter multifatorial da etiologia das DTMs, o diagnóstico diferencial é mister para o correto tratamento, uma vez que o paciente geralmente busca o tratamento quando um quadro de dor crônica já encontra-se instalado (mais de 3 meses), sendo, portanto, algumas vezes necessário lançar mão de várias abordagens farmacológicas, incluindo drogas de ação periférica e central para dirimir o quadro de doloroso e extremamente incapacitante.

Apesar do curso extremamente incapacitante das DTM, nenhuma das intervenções terapêuticas disponíveis na atualidade é curativa, limitando-se, portanto a aliviar os sinais e sintomas da doença. A compreensão da fisiopatologia da artrite ATM, elucidando os mediadores inflamatórios envolvidos no surgimento de suas alterações inflamatórias poderá contribuir para a introdução de novas abordagens terapêuticas mais específicas, trazendo benefícios superiores a um tratamento paliativo.

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 plenamente esses processos. Citocinas como interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ), fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8), e outros mediadores como serotonina (5-HT), neuropeptídeos, prostaglandinas (PGs) como PGE2 e PGJ2, leucotrienos (LTs), imunoglobulinas, óxido nítrico (NO) e receptores opióides  $\mu$  e  $\kappa$  já foram descritos

como importantes nesse processo (ALSTERGREN et al., 2000; QUINN et al., 2000; YAMAZA et al., 2003; KANEYAMA et al., 2002; 2005a; 2005b; FREDRIKSSON et al., 2005; CHANG; ISRAEL, 2005; KYRKANIDES et al., 2007; VERNAL et al., 2008; CHICRE-ALCÂNTARA et al., 2012; QUINTEIRO et al., 2012).

Estudos sugerem que IL-1 $\beta$  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; OGURA et al., 2005; SATOH et al., 2009).

Kubota et al. (1998) mostraram haver relação entre a presença de IL-1 $\beta$  e o desenvolvimento de osteoartrite na ATM. Alstergren et al. (1998; 1999), Kaneyama et al. (2002), Matsumoto et al. (2006) e Vernal et al. (2008) observaram aumento da dosagem de IL-1 $\beta$  em ATMs acometidas por processo inflamatório quando comparado a articulações normais, e sugeriram relação entre IL-1 $\beta$  e sintomatologia dolorosa, limitação nos movimentos mandibulares e desarranjos internos articulares. Ijima et al. (2001) demonstraram que também IL-1 $\alpha$  é capaz de induzir síntese de MMPs por condrócitos e células do disco articular. Tominaga et al. (2004) reafirmaram a participação de IL-1 $\beta$  na patogênese das DTMs, assim como Nishimura et al. (2004) ao mostrar que, nos casos de insucesso na realização de artrocentese, IL-1 $\beta$  e IL-6 continuavam presentes no líquido sinovial articular. Experimentalmente, foi detectada IL-1 $\beta$  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).

Sabe-se que fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) exerce funções de ativar linfócitos, de estimular a síntese de outras citocinas como IL-1 $\beta$  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., 2000; OGURA et al., 2005; KE et al., 2007).

Foram encontrados níveis elevados de TNF $\alpha$  em ATMs sintomáticas quando comparados a articulações normais (SHAFER et al., 1994; NORDAHL et al., 2000; EMSHOFF et al., 2000). TNF $\alpha$  provavelmente atua na sensibilização de

nociceptores indiretamente, por desencadear o aumento da produção de IL-1 $\beta$ , exercendo papel importante nos processos de hiperalgesia e alodinia participando da fisiopatologia da dor articular da ATM (NORDAHL et al., 2000).

Autores como Fu et al. (1995), Emshoff et al. (2000), Kaneyama et al. (2002) e Vernal et al. (2008) discutiram que TNF $\alpha$  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 $\alpha$  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).

Felizmente, os sistemas biológicos dispõe de vias contra-regulatórias que também modulam a resposta inflamatória, ativando sistemas de defesa em células expostas ao estresse, promovendo um feedback negativo na ativação celular e geração de mediadores inflamatórios. Neste sentido, a via da hemeoxigenase (HO) mostra sua relevância. Nosso grupo de pesquisa foi o primeiro a demonstrar o envolvimento da via da hemeoxigenase-1 na dor orofacial, trabalhando com o modelo experimental de hipernocicepção inflamatória articular (CHAVES, 2012). Sabendo que essa via exerce uma ação importante anti-nociceptiva e antiinflamatória, pretendemos então investigar sua interação com óxido nítrico e as citocinas TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ .

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 microsossomal 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).

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). HO-2 e HO-3 são as formas constitutivas expressas na maioria dos tecidos (ALCARAZ et al., 2003).

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 (ALCARAZ et al., 2003).

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).

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 (YACHIE et al., 2003).

De fato, HO-1 é induzida em uma variedade de células como endotélio, monócitos/macrófagos, neutrófilos e fibroblastos (ALCARAZ et al., 2003; 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 GMPc (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 (PETRACHE et al., 2000; BARANANO; SNYDER, 2001). 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, e também através de sistemas de transdução de sinais via GMPc) (OTTERBEIN et al., 2000). Esses efeitos bioquímicos resultam na inibição da síntese de citocinas pró inflamatórias como IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  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 espinal da dor tanto inflamatória quanto não inflamatória (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 (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.

Tem-se demonstrado 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 $\beta$ , obtidos de pacientes com osteoartrite em joelhos, observou-se que a indução de HO-1 reduziu a expressão de MMPs, a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF $\alpha$  e IL-6, assim como de PGE2, nitrito, TGF $\beta$ 2 (fator transformador de crescimento), TGF $\beta$ 3, e a atividade das enzimas iNOS, 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 $\beta$ , TNF $\alpha$  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 $\beta$  não aumentaram expressão de HO-1 (VALVASON et al., 2008).

Em sinoviócitos de pacientes com artrite reumatóide (AR), cultivados com IL-1 $\beta$ , 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 $\beta$  e TNF $\alpha$ , e inibida por IFN- $\gamma$  (interferon gama) (KITAMURA et al., 2011), assim como a estimulação de HO-1 inibiu o fator de transcrição NF- $\kappa$ B inibindo a expressão de IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  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 líquido 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  $IL-1\beta$ ,  $IL-6$  e  $TNF\alpha$ , 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  $IL-1\beta$ ,  $IL-2$ ,  $IL-6$ ,  $TNF\alpha$  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).

Outra via sinalizadora da resposta imune-inflamatória é a via do óxido nítrico (NO). O NO é formado através de uma reação catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) em que o oxigênio molecular ( $O_2$ ) é fonte do oxigênio e a L-arginina é a fonte do nitrogênio de seu grupo guanidino terminal (MONCADA et al., 1991, 1993). Diversos tipos celulares são capazes de sintetizar NO, incluindo células endoteliais, macrófagos, neutrófilos (WRIGHT et al., 1989), fibroblastos (WERNER-FELMAYER et al., 1990), osteoblastos e osteoclastos (EVANS; RALSTON, 1996), células neuronais (KNOWLES et al., 1989), sinoviócitos (MCINNES et al., 1996) e condrócitos (STADLER et al., 1991).

Três isoformas distintas da NOS foram identificadas: uma isoforma neuronal (NOS<sub>n</sub>), inicialmente isolada do cérebro (SESSA et al., 1992), uma endotelial (NOS<sub>e</sub>), isolada do endotélio (Lamas et al., 1992) e uma isoforma induzida (iNOS),

isolada inicialmente de macrófagos (Xie et al., 1992). A NOSn e NOSe são expressas constitutivamente em seus tecidos de origem, portanto referidas como NOS constitutivas (NOSc), enquanto a iNOS é expressa durante processos patológicos. O NO pode ainda ser gerado independente de enzimas a partir do nitrito no ambiente ácido do estômago e farmacologicamente por compostos doadores de NO usados clinicamente como vasodilatadores (Moncada et al., 1993).

O NO é produzido pelas células residentes articulares sinoviócitos e condrócitos, assim como por osteoblastos e osteoclastos, e também por células inflamatórias presentes durante patologias, de forma constitutiva ou induzida por mediadores como IL-1 e TNF $\alpha$  (STADLER et al., 1991; MCINNES et al., 1996; EVANS; RALSTON, 1996).

Em pacientes com artrite reumatóide (AR) e osteoartrite (OA), foi detectada elevada concentração de nitrito (produto da degradação do NO) e de s-nitrosoproteínas (forma ativa estável de estoque do NO) no plasma e no fluido sinovial, aumento da excreção urinária de nitrato (produto da degradação do NO e presença de iNOS em células sinoviais, condrócitos e células do músculo liso vascular articulares (FARRELL et al., 1992; GRABOWSKI et al., 1997; HILLIQUIN et al., 1997).

Em modelos animais de artrite por *Streptococcus*, foi comprovado o aumento da produção do NO, de maneira que o uso de inibidores de sua síntese NG-monometil-L-arginina (L-NMMA) reduziu o edema e o infiltrado celular (MCCARTNEY-FRANCIS et al., 1993). Em artrite induzida por colágeno, observou-se expressão de iNOS em tecido sinoviais (CANNON et al., 1996), sendo esta expressão inibida pela administração de inibidores seletivos da iNOS (aminoguanidina ou N-iminoetil-L-lisina - L-NIL) (VERMEIRE et al., 2000). Nosso grupo recentemente demonstrou que o NO participa na fisiopatologia da artrite induzida por zymosan na articulação temporomandibular (ATM) de ratos (CHAVES et al., 2011). Entretanto, alguns autores demonstraram um efeito dual do NO em modelo de artrite induzida pela injeção de zymosan em joelho de ratos, uma vez que a administração local de um doador de NO reduziu a dor inflamatória nesse modelo (ROCHA et al., 2002). Além disso, nesse mesmo trabalho os autores demonstraram que a administração profilática de inibidores da NOS reduziu a dor inflamatória (ROCHA et al., 2002).

Neste sentido, apesar dos diversos trabalhos na literatura, o envolvimento do NO na fisiopatologia da artrite ainda carece de maiores elucidações, uma vez que o NO

parece promover ações pró-inflamatórias como aumento da permeabilidade vascular, produção de radicais livres capazes de causar danos teciduais, indução de cicloxigenase e de citocinas inflamatórias (MCINNES et al., 1996), concomitante à sua ação antiinflamatória, como inibição da adesão plaquetária e neutrofílica e redução da migração leucocitária ao sítio inflamatório (THOMASSEN; KAVURU, 2001).

Considerando-se que a resposta inflamatória é orquestrada por vários mediadores inflamatórios, um dos objetivos desse projeto foi avaliar a possível inter-relação entre citocinas inflamatórias, HO-1 e NO na hipernocicepção articular inflamatória induzida por zymosan na ATM de ratos.

As citocinas podem induzir a expressão da HO-1 em algumas situações através da geração de espécies reativas do oxigênio. Por outro lado, essa enzima pode modular a produção de citocinas pró ou anti-inflamatórias como parte de um processo fisiológico que limita a toxicidade das citocinas. Desta forma, o controle da produção de citocinas pode ser um importante mecanismo de atuação da HO-1 (ALCARAZ et al., 2003). No modelo de bolsa de ar induzido por zymosan em camundongos demonstrou-se que a administração de hemina, substrato da HO-1, potencializou a indução dessa enzima ao mesmo tempo em que reduziu os níveis de TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  (VICENTE et al., 2003).

A hipersensibilidade mecânica induzida pela injeção intra-plantar em ratos de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  foi aumentada pelo pré-tratamento com ZnDPBG, inibidor da HO, sugerindo que a via HO/CO é ativada por essas citocinas (STEINER et al., 2001). Neste aspecto alguns autores demonstraram que TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  medeiam a super-expressão de HO-1 em resposta ao LPS (VICENTE et al., 2003).

A relação entre HO-1 e NO vem representando pauta de muitas investigações. De fato, os genes da HO-1 e iNOS são ativados simultaneamente após estimulação com zymosan de macrófagos peritoneais de camundongos (VICENTE et al., 2003). A indução da HO-1 é muito sensível a estímulos pró-oxidantes, de modo que NO ou espécies derivadas como o peroxinitrito induzem HO-1 em muitos tipos celulares (MOTTERLINI et al., 2002).

HO-1 pode também estar associada com as ações citoprotetoras de baixas concentrações de NO através da geração de CO que previne a apoptose produzida por altas concentrações de NO (CHOI et al., 2003). Por outro lado, a atividade da HO-1 pode levar a inibição da expressão da iNOS, diminuindo a produção de NO.

Este mecanismo representa um controle da produção excessiva de NO, prevenindo seus efeitos citotóxicos (ALCARAZ et al., 2003). Neste sentido, alguns autores demonstraram que HO-1 reduz a produção de NO em macrófagos estimulados por endotoxinas, e em células epiteliais de intestino de humanos, onde a hemina inibiu a atividade da iNOS por citocinas (CAVICCHI et al., 2000).

Ademais, foi demonstrado que HO-1 inibe a expressão de iNOS em modelos de inflamação intestinal (GUO et al., 2001). Ainda, foi demonstrado que um doador de NO (SNAP) aumentou a produção de bilirrubina no exsudado peritoneal induzido por carragenina, mostrando que o NO aumenta a atividade da HO (FREITAS et al., 2006). Por outro lado, no modelo de bolsa de ar induzido por zymosan o uso de aminoguanidina, inibidor seletivo da NOSi, reduziu a expressão de HO-1, sugerindo a participação do NO nos mecanismos responsáveis pela síntese de HO-1 nesse modelo (VICENTE et al., 2003).

Portanto, essas observações demonstram que citocinas, e as vias da HO-1 e do NO partilham características em comum, que fomentaram nosso interesse em investigar uma possível inter-relação entre esses mediadores no modelo de artrite na ATM por zymosan em ratos, o que poderá contribuir para a elucidação dos eventos celulares e moleculares envolvidos na resposta inflamatória.

O caráter multifatorial da DTM dificulta não só o diagnóstico como também o seu tratamento. As intervenções terapêuticas farmacológicas disponíveis atualmente destinam-se ao controle da dor por meio do uso de drogas anti-inflamatórias não-esteroidais (DAINES), agente semelhantes a morfina, anétesicos e várias substâncias não opióides tem sido a abordagem, muitas vezes, de primeira escolha, para o alívio das dores e demais sintomas associados. Contudo, o tratamento deve priorizar intervenções conservadoras diante de quadros não-cirúrgicos e que não apresentem degeneração das partes moles e nem óssea da ATM (Cairns, 2010). Outras modalidades terapêuticas incluem placas oclusais, fisioterapia, exercícios madibulares, acupuntura, laserterapia, toxina botulínica, dentre outros (Okeson, 2008; Fernandes *et al.*, 2008).

Neste sentido a busca de novas terapias, para o controle da dor inflamatória é de grande importância. Onde a investigação de novas fontes naturais que possam gerar novos fármacos mais efetivos e com baixa toxicidade, possuindo efeitos adversos mínimos assim como a elucidação de seu mecanismos moleculares envolvidos, vem se destacando na última década e despertado o interesse da

comunidade científica a fim de minorar os efeitos pró-inflamatórios advindos das DTMs. Dentre esses recursos naturais, podemos citar as lectinas (do Val et al., 2014; Rivanor et al., 2014; Rodrigues et al., 2014).

## **1.2 Hipernocicepção Inflamatória Induzida por Zymosan**

Vários modelos experimentais têm sido desenvolvidos para o estudo das algias e alterações inflamatórias da ATM. Alguns autores propõem a indução da osteoartrite através de procedimentos cirúrgicos (HELMY et al., 1988; ISHIMARU et al., 1994; LEKKAS, 1994) ou mecânicos (IMAI et al., 2001), outros, entretanto, induzem alterações inflamatórias através da injeção intra-articular de estímulos químicos (ROVERONI et al., 2001; DENADAI-SOUZA et al., 2009).

Zymosan (Zy) é um polissacarídeo derivado da parede celular do fungo *Saccharomyces cerevisiae*, sendo seu principal componente estrutural a  $\beta$ -glucana que apresenta propriedades imunoestimulatórias, capazes de ativar macrófagos e outras células mononucleares (DERBOCIO et al., 2005). Quando injetado intradérmica (RIDGER et al., 1997), intraperitoneal (AJUEBOR et al., 1998) ou intra-articularmente (ROCHA et al., 1999) causa uma resposta inflamatória intensa que pode levar a uma sinovite erosiva grave (KEYSTONE et al., 1989) associada com hiperalgesia (TONUSSI; FERREIRA, 1992).

No início, a inflamação mediada por zymosan foi caracterizada como a ativação da via alternativa do complemento, levando a produção da anfilotoxina C5a, com uma subsequente ativação de monócitos levando ao acúmulo de um infiltrado neutrófilo. Zy é reconhecido pelo receptor de lectina 1 que é expresso em monócitos, macrófagos, neutrófilos e células dendríticas. Após o reconhecimento, esse composto, estimula a produção de citocinas inflamatórias. Zymosan também é capaz de induzir a degranulação de mastócitos liberando aminas vasoativas como serotonina e histamina, além de gerar produtos do metabolismo do ácido araquidônico (WILLMENT, 2003; COATES & MCCOLL, 2001; VALE et al., 2006). Além de produzir reação inflamatória intensa, caracterizada por extensa sinovite, a artrite induzida por Zy também produz hipernocicepção (ROCHA et al., 1999).

A injeção de Zy na cavidade articular de joelho provoca aumento da permeabilidade vascular levando a um edema local e ainda, acentuado influxo celular com predomínio de polimorfonucleares (PMNs), sendo a quantidade de células presentes no líquido sinovial máxima na sexta hora após a indução (ROCHA

et al., 2003). Posteriormente, desenvolve-se sinovite com infiltrado mononuclear e reação fibroblástica semelhante a uma sinovite crônica que caracteriza o pannus reumatoide (KEYSTONE et al., 1977). Em outros estudos foi sugerido a ocorrência da degradação da cartilagem articular e do osso subcondral na fase crônica da artrite induzida por zymozan (GEGOUT et al., 1995; BEZERRA et al., 2004).

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

### **1.3 Lectina de *Abelmoschus esculentus***

O quiabeiro (*Abelmoschus esculentus* Moench.), espécie pertencente à família Malvaceae, é originário da África e desenvolve-se melhor nas regiões tropicais, subtropicais e nas áreas mais quentes nas zonas temperadas, desenvolvendo-se bem em temperaturas entre 18 e 35°C (CASTRO, GODOY E CARDOSO, 2008).

Segundo Panero e colaboradores (2009) possui alto valor nutritivo, medicinal e comercial, tem um ciclo vegetativo rápido, de fácil cultivo e de alta rentabilidade. Além de ser usado na alimentação, também é utilizado em medicina nos casos de pneumonia, bronquites e tuberculose pulmonar, atuando também como laxante. Ainda segundo esses autores, os testes de atividade biológica da lectina de farinha de sementes previamente purificada apresentaram atividade anti-inflamatória, antinociceptiva e não apresentou citotoxicidade frente hemácias do sistema ABO. Ainda, pré-tratamento (i.v.) de ratos com a lectina de *Abelmoschus esculentus* (0,01; 0,1 ou 1mg/kg) reduziu de forma significativa e dose dependente o edema de pata induzido por carragenina (15%, 21,6% e 44%, respectivamente).



A origem da palavra lectina é proveniente do latim, “legere” que significa selecionar ou escolher e foi utilizado para definir uma classe de aglutininas de plantas superiores (BOYD et al., 1954). Muitas definições foram dadas ao longo dos anos, na tentativa de melhor conceituá-las. No entanto, a definição mais aceita na comunidade científica foi proposta por Peumans & Van Damme (1995), na qual lectinas são proteínas ou glicoproteínas de origem não imune contendo pelo menos um domínio não catalítico que se liga reversivelmente a mono ou oligossacarídeos específicos. Essa ligação a resíduos de carboidratos pode ser de alta especificidade, mas não altera a estrutura química dos ligantes. As lectinas possuem ampla distribuição na natureza e já foram encontradas em bactérias, fungos, algas, plantas superiores, vertebrados, invertebrados e vírus (LIS & SHARON, 1986; RÜDIGER & GABIUS, 2001).

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

Nas últimas décadas, pesquisadores têm voltado sua atenção à utilização de recursos naturais na perspectiva de avaliar a eficácia e segurança dos mesmos (Cairns, 2010). A utilização de substâncias naturais como a *Tephrosia toxicaria* e *Caulerpa cupressoides*, assim como lectinas e polissacarídeos advindos de algas marinhas no tratamento das condições inflamatórias das DTMs, já foi demonstrada pelo nosso grupo de pesquisa em ensaios pré-clínicos (do Val et al., Rivanor et al., 2014; Rodrigues et al., 2014). Ademais, atividade inflamatória, anti-inflamatória, anti-nociceptiva (Alencar et al., 2007; Assreuy et al., 2009; Rangel et al., 2011; Figueiredo et al., 2009), e ausência de citotoxicidade aguda e crônica na utilização de lectinas (Sabitha et al., 2011; Kumar et al., 2009) também foram constatadas.

Diversas são as investigações que têm descrito as atividades biológicas das lectinas tem aumentando o interesse e segurança na utilização dessas proteínas para fins terapêuticos, como, por exemplo, estudos que mostram a utilização de uma variedade vegetal dessa proteína na modulação da ligação de insulina ao seu

receptor de fator de crescimento 1, a síntese de óxido nítrico e até mesmo inibição do sistema nervoso central, através do mecanismo dependente de GABA (Maniskosa *et al.*, 2008; Vasconcelos *et al.*, 2009).

Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo investigar a eficácia anti-nociceptiva e anti-inflamatória da lectina de *Abelmoschus esculentus* no modelo de hipernocicepção inflamatória induzida por zymosan na articulação temporomandibular de ratos. Foi avaliado ainda, com base em estudos prévios da literatura, o envolvimento das vias da hemeoxigenase, óxido nítrico e das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  sobre a eficácia de AEL.

## 2. HIPÓTESES

1) A administração da lectina de *Abelmoschus esculentus* reduz a hipernocicepção inflamatória induzida pela injeção de zymosan na articulação temporomandibular (ATM) de ratos, assim como os parâmetros inflamatórios (migração celular, atividade de mieloperoxidase e expressão de proteínas inflamatórias) observados durante o curso evolutivo da hipernocicepção inflamatória induzida pela injeção de zymosan na ATM de ratos.

2) A constatação da eficácia da lectina de *Abelmoschus esculentus* nesse modelo permitirá a oferta de uma terapia nas DTM com baixa toxicidade, aumentando a adesão do paciente e as chances de êxito da terapia, contribuindo para uma melhor qualidade de vida dos pacientes que padecem destes processos inflamatórios dolorosos.

### 3. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

A artrite na articulação temporomandibular (ATM), é uma doença inflamatória de etiologia multifatorial, com grande comprometimento funcional, reduzindo a qualidade de vida dos indivíduos acometidos. Apesar de seu potencial destrutivo e extremamente incapacitante, nenhuma das intervenções terapêuticas disponíveis na atualidade é curativa, limitando-se portanto a aliviar os sinais e sintomas da doença. A compreensão da fisiopatologia da artrite na ATM, elucidando os mediadores inflamatórios envolvidos no surgimento das alterações destrutivas desse processo nosológico, poderia contribuir para a introdução de novas abordagens terapêuticas mais específicas que trariam benefícios superiores a um tratamento paliativo.

Inúmeros estudos versando sobre a fisiopatologia dos fenômenos dolorosos e inflamatórios da ATM, os eventos moleculares que formam a base desse processo nosológico ainda carecem de maiores elucidações. Neste aspecto, estudos pré-clínicos que possam elucidar os caminhos da dor durante o curso da artrite na ATM poderão contribuir sobremaneira para o desenvolvimento da ciência básica, fornecendo substrato para a pesquisa clínica de modo a assegurar uma melhor qualidade de vida para esses doentes, com a possibilidade de desenvolvimento de opções terapêuticas eficazes e seguras.

O conhecimento sobre produtos naturais é, muitas vezes, o único recurso terapêutico de variadas comunidades e grupos étnicos em todo o mundo. A pesquisa de recursos naturais tem-se revelado promissora na descoberta de ferramentas farmacológicas que podem ser utilizadas para testes de novas substâncias ou mesmo em testes diagnósticos. Essa prática vem despertando nas últimas décadas a atenção da comunidade científica na perspectiva de avaliar a eficácia e segurança desses recursos naturais.

A despeito da rica biodiversidade da flora nacional e do uso de plantas medicinais pelas comunidades para alívio de processos inflamatórios dolorosos, a literatura ainda carece de estudos que demonstrem o uso desses produtos nas DTMs. Neste sentido, o esclarecimento de um possível papel da lectina de *Abelmoschus esculentus* sobre a geração dos principais mediadores inflamatórios que participam na hipernocicepção inflamatória induzida por zymosan na ATM de ratos poderá contribuir para a introdução de uma nova abordagem terapêutica no tratamento dessa patologia.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Geral

Avaliar a eficácia antinociceptiva e anti-inflamatória da lectina de *Abelmoschus esculentus* no modelo de hipernocicepção inflamatória induzida por zymosan na articulação temporomandibular (ATM) de ratos.

### 4.2 Específicos

1. Investigar o efeito antinociceptivo da lectina de *Abelmoschus esculentus* no modelo de hipernocicepção induzida por zymosan na ATM de ratos;
2. Investigar o efeito anti-inflamatório da lectina de *Abelmoschus esculentus* no modelo de hipernocicepção inflamatória induzida por zymosan na ATM de ratos, analisando-se os seguintes parâmetros:
  - a. Migração de neutrófilos para a região articular e periarticular;
  - b. Análise histopatológica da articulação temporomandibular;
  - c. Dosagem de citocinas (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) nos tecidos periarticulares e gânglio trigeminal;
  - d. Imunoexpressão de citocinas (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) nos tecidos articulares.
3. Investigar o envolvimento da via da hemeoxigenase (HO-1) e do óxido nítrico no efeito antinociceptivo/anti-inflamatório da lectina de *Abelmoschus esculentus* no modelo de hipernocicepção inflamatória induzida por zymosan na ATM de ratos.

## 5. ARTIGO

**Lectin from *Abelmoschus esculentus* reduces zymosan-induced temporomandibular joint inflammatory hypernociception in rats via heme oxygenase-1 pathway integrity and TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  suppression**

Freitas, R.S., do Val, D.R., Fernandes, M.E.F., Gomes, F.I.F., de Lacerda, J.T.J.G., Santi-Gadelha, T., Gadelha, C.A.A., Pinto, V.P.T., Cristino-Filho, G., Pereira, K.M.A., Brito, G.A.C., Bezerra, M.M., Chaves, H.V.

Artigo publicado no periódico *International Immunopharmacology*, v.38, 313–323.

<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2016.06.012>

**Lectin from *Abelmoschus esculentus* reduces zymosan-induced temporomandibular joint inflammatory hypernociception in rats via heme oxygenase-1 pathway integrity and TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  suppression**

<sup>1</sup>Raul Sousa Freitas, <sup>2</sup>Danielle Rocha do Val, <sup>3</sup>Maria Ester Frota Fernandes, <sup>3</sup>Francisco Isaac Fernandes Gomes, <sup>4</sup>José Thalles Jocelino Gomes de Lacerda, <sup>4</sup>Tatiane Santi-Gadelha, <sup>4</sup>Carlos Aberto de Almeida Gadelha, <sup>5</sup>Vicente de Paulo Teixeira Pinto, <sup>5</sup>Gerardo Cristino Filho, <sup>3</sup>Karuza Maria Alves Pereira, <sup>6</sup>Gerly Anne de Castro Brito, <sup>2</sup>Mirna Marques Bezerra, and <sup>3,\*</sup>Hellíada Vasconcelos Chaves

<sup>1</sup>Master in Biotechnology, Federal University of Ceará, Sobral, Brazil; Avenida Comandante Maurocélío Rocha Pontes, 100 Derby - CEP: 62.042-280, Sobral - Ceará – Brazil;

<sup>2</sup>Northeast Biotechnology Network (Renorbio), Federal University of Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235 Cidade Universitária CEP: 50670-901, Recife, Pernambuco, Brazil

<sup>3</sup>Faculty of Dentistry, Federal University of Ceará, Avenida Comandante Maurocélío Rocha Pontes, 100 Derby - CEP: 62.042-280 Sobral, Ceará, Brazil;

<sup>4</sup>Department of Molecular Biology, Federal University of Paraíba, Cidade Universitária, CEP: 58059-900 João Pessoa, Paraíba, Brazil;

<sup>5</sup>Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Avenida Comandante Maurocélío Rocha Pontes, 100 Derby - CEP: 62.042-280 Sobral, Ceará, Brazil;

<sup>6</sup>Department of Morphology, Federal University of Ceará, Rua Delmiro de Farias, Porangabussu, CEP:60440-261 Fortaleza, Ceará, Brazil.

**\*Corresponding author:**

Profa. Dra. Hellíada V. Chaves

Faculty of Dentistry of Sobral - Federal University of Ceará

Avenida Comandante Maurocélío Rocha Pontes, 100

Derby - CEP: 62.042-280

Phone: 55 88-3611-2202 - Fax: 55 88-3611- 8000

Sobral - Ceará - Brazil

E-mail: helliadachaves@yahoo.com.br

**Funding Sources:** This work was supported by Brazilian grants from Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Instituto de Biomedicina do Semi-Árido Brasileiro (INCT-IBSAB). The authors thank Adalberto Nascimento de Lima Júnior and Jordânia Marques de Oliveira for the technical assistance provided.

### **Abstract**

*Abelmoschus esculentus* (Okra), an African plant cultivated in northeastern Brazil, is used for different medicinal purposes. Here we investigated *Abelmoschus esculentus* lectin (AEL) efficacy in zymosan-induced temporomandibular joint (TMJ) inflammatory hypernociception in rats. Rats were pretreated with AEL (0.01, 0.1 or 1 mg/kg) before zymosan (Zy) injection in the TMJ. Further, rats were pretreated with ZnPP-IX (3 mg/kg), a specific HO-1 inhibitor, or aminoguanidine (30mg/kg), a selective iNOS inhibitor, before AEL. Von Frey test was used to evaluate hypernociception. 6 h after Zy synovial fluid was collected for leukocyte counting and myeloperoxidase (MPO) activity; and TMJ tissue for histopathological analysis (H&E) and immunohistochemistry for TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and HO-1. Vascular permeability was evaluated by Evans Blue extravasation. Also, TMJ tissue and trigeminal ganglion were removed for TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  dosage (ELISA). AEL increased nociceptive threshold. AEL reduced cell influx, MPO activity, cell influx in synovial membrane, and Evans Blue extravasation. AEL increased HO-1 expression while decreased both TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  expression. AEL effects were not observed in the presence of ZnPP-IX. AEL reduced TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  levels in both TMJ tissue and trigeminal ganglion. AEL efficacy in zymosan-induced TMJ inflammatory hypernociception in rats depends on TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  inhibition and HO-1 pathway integrity.



**Keywords:** *Abelmoschus esculentus*, temporomandibular joint, hypernociception, HO-1 pathway, lectin.

## 1. Introduction

Temporomandibular joint (TMJ) disorders are a group of conditions that result in TMJ pain, which frequently limits talking, chewing, and other basic daily activities with high levels of inflammatory pain-related disability (Cairns, 2010). Experimental models that allow the study of the mechanisms underlying these inflammatory and pain conditions are of great clinical relevance. In this regard, we have developed a rat model of TMJ inflammation using intra-articular injections of pro-inflammatory agent zymosan (Chaves *et al.*, 2011). Zymosan is a polysaccharide from yeast cell walls that produces a severe and erosive synovitis (Gegout *et al.*, 1994; Bezerra *et al.*, 2004) associated with inflammatory pain in animal models of knee inflammatory hypernociception (Bezerra *et al.*, 2007).

The temporomandibular joint inflammation is the result of the release of pro-inflammatory cytokines, in particular tumor necrosis factor alpha (TNF) and interleukins, which contributes to the degradation and remodeling of joint cartilage. Increased levels of pro-inflammatory cytokines (IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ ) have been detected in patients with temporomandibular disorders (TMD), suggesting that these cytokines may play a role in the pathogenesis of synovitis (Vernal *et al.*, 2008; Cairns, 2010). Over the last few years numerous studies have led to the appreciation of heme oxygenase 1 (HO-1). To date, three isoforms of HO (HO-1, HO-2, and HO-3) have been identified. HO-1 is inducible, whereas HO-2 and HO-3 are constitutively expressed (Vicente *et al.*, 2003; Bednarz *et al.*, 2007).

HO-1 is induced in a variety of cells including endothelial cells, monocytes/macrophages, neutrophils and fibroblasts by heme, endotoxins, cytokines, nitric oxide and other mediators produced during inflammatory responses (Botros *et al.*, 2005; Bressan and Tonussi, 2008; Choi *et al.*, 2008), and its induction would provide a negative feedback for cell activation and the production of inflammatory mediators, beyond its role in the antioxidant defense system, which could modulate at least in part the inflammatory pain process (Alcaraz *et al.*, 2003; Cunha *et al.*, 2006). In inflammatory and immune conditions, high levels of mediators with the potential to induce HO-1 are produced, and the expression of this protein could be part of an adaptive mechanism for limiting cytotoxicity via several means,

including radical scavenging or inhibition of cell proliferation and apoptosis (Devesa, *et al.*, 2005).

In order to develop potential tools for new therapies to ameliorate inflammatory pain there has been a continuous increase in the use of natural products in the last decades, which have encouraged scientific studies to search for new substances with therapeutic action and to confirm the efficacy of medicines derived from plants. In recent years there has been growing interest in alternative therapies and the use of natural products, especially those derived from plants (Calixto *et al.*, 2004; Val *et al.*, 2014; Rivanor *et al.*, 2014).

The *Abelmoschus esculentus* (Malvaceae) plant is originated from Africa and has spread across a number of tropic countries, including northeastern Brazil. The plant has been used to treat various disorders, such as cancer, microbial infections, hypoglycemia, constipation, urine retention and inflammation (Monte, *et al.*, 2013; Messing, *et al.*, 2014). Some recent studies have demonstrated a antinociceptive and anti-inflammatory activities of the *Abelmoschus esculentus* lectin (AEL) (Soares, *et al.*, 2012). Thus, the present study was aimed at investigating the unexplored antinociceptive and anti-inflammatory efficacy of AEL in the model of zymosan-induced TMJ inflammatory hypernociception in the rat. Additionally, considering our previous findings showing that the inhibition of HO-1 pathway is associated with worsening of inflammatory response (Grangeiro *et al.*, 2011), we also investigated whether AEL efficacy depends on the integrity of the HO-1 pathway. Additionally, we investigated the putative involvement of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and nitric oxide (NO) in AEL efficacy.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1. Plant Material**

Seeds of *Abelmoschus esculentus* were collected in the municipality of Conde, Paraíba, Brazil for the botanical identification. The species were identified by Prof. Dra. Rita Balthazar de Lima (Department of Botany, Federal University of Paraíba - UFPB, Brazil) as pertinent the Malvaceae, whose scientific name is *Abelmoschus esculentus* family. The excicata was deposited in the Herbarium of UFPB under No. 41386. Purification of the lectin was performed in BioGeR (Laboratory of Biochemical Genetics and Radiobiology), according to the methodology developed by Smith *et al.*, 1994.

## 2.2. Extraction of Lectin

The seeds were ground to form flour and its lipids were removed with n-hexane. To obtain the protein extract, flour was placed in contact for 3 hours in Tris - HCl buffer pH 7.4 with 0.1 M NaCl 0.15 M. The extract was centrifuged at 5.000 rpm at 4° C for 20 minutes, the precipitate was discarded, and the supernatant was subjected to ammonium sulfate precipitation, obtaining a lectin fraction in the range of 30-60 % saturation. The lectin fraction was dialysed exhaustively against water and then lyophilized. After lyophilization, the lectin was isolated by ion exchange chromatography on DEAE - Sephacel equilibrated with bibasic sodium phosphate 0.025 M pH 7.4. Elution of the lectin was done with the gradient of bibasic sodium phosphate 0.025 M NaCl pH 7.4 and 1M. Elution was monitored by spectrophotometer at a wavelength of 280 nm. After elution the *Abelmoschus esculentus* lectin was dialyzed against water, frozen and lyophilized.

## 2.3. Animals

Male *Wistar* rats (160–220 g) (n=60) were housed in standard plastic cages with food and water available *ad libitum*. They were maintained in a temperature-controlled room (23±2° C) with a 12/12-hour light-dark cycle. All experiments were designed to minimize animal suffering and to use the minimum number of animals required to achieve a valid statistical evaluation. This study was conducted in accordance with the Institutional Animal Care and with the approval of the Ethics Committee of the Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil (CEPA nº. 74/2013).

## 2.4. Induction of TMJ inflammatory hypernociception

Rats were briefly anesthetized with inhaled isoflurane and received an intra-articular (i.art.) injection of 2 mg zymosan (40 µL total volume) dissolved in sterile saline into the left TMJ using a 30-gauge needle and 0.5 mL syringe. Sham animals received only saline i.art. Before zymosan or saline injections, the TMJ skin region was carefully shaved, the postero-inferior border of the zygomatic arch was palpated, and the needle was inserted inferior to this point and advanced in a medial and anterior direction until the needle made contact with the condyle. This contact was verified by the moving of the mandible, and the puncture of the needle into the joint space was confirmed by the loss of resistance. Gentle aspiration ruled out

intravascular placement, after which the specified volume of zymosan or saline was injected.

As shown by our group previously (Chaves *et al.*, 2011) during the time course of zymosan TMJ inflammatory hypernociception development, it is maximal at 4 h of arthritis whereas cell influx peaks at 6 h. Based on these results we used these time points to assess both nociceptive (head withdrawal threshold) and inflammatory parameters (total cell counting and myeloperoxidase assay).

## **2.5. Evaluation of inflammatory hypernociception**

Inflammatory hypernociception in the TMJ was evaluated by measuring the threshold of force intensity that needed to be applied to the TMJ region until the occurrence of a reflex response of the animal (e.g., head withdrawal). The measurements were performed by an examiner unaware of the treatments and used a digital device (Insight, Ribeirão Preto, SP, Brazil) that consisted of a rigid filament linked in an electronic device that measured the response threshold in grams (g) when the filament was applied to the surface of the tested region (Denadai *et al.*, 2009). The facial areas to be tested around the TMJ were carefully shaved, and the animals were put into individual plastic cages 45 min before the beginning of the tests. The animals were submitted to a conditioning session of head withdrawal threshold measurements in the testing room for 4 consecutive days under controlled temperatures ( $23\pm 2^{\circ}$  C) and low illumination. On the fifth day, the basal force threshold value was recorded (in triplicate) before the i.art. injections of either zymosan or vehicle and after 4 h.

## **2.6. Synovial Lavage Collection and Cell Counting**

Six hours (6 h) after zymosan-injections the rats were sacrificed under anesthesia and exsanguinated. The superficial tissues were dissected, and the TMJ cavity was washed to collect the synovial lavage by a pumping and aspiration technique using 0.05 mL of EDTA in neutral buffered PBS. This procedure was repeated twice. The total number of white cells in the synovial lavage was counted using a Neubauer chamber.

## **2.7. Myeloperoxidase Activity Analysis**

Myeloperoxidase (MPO) is an enzyme found primarily in the azurophilic granules of the neutrophils and has been used extensively as a biochemical marker of granulocyte infiltration into various tissues. The MPO activity assay measurement has been described previously by Bradley et al. (1982). In our study, the MPO assay was conducted on the collected synovial lavage at 6 h after zymosan injection. Briefly, the synovial lavage was centrifuged at 4,500 rpm for 12 min at 4° C. MPO activity was assayed by measuring the change in absorbance at 450 nm using o-dianisidine dihydrochloride and 1 % hydrogen peroxide. The results are reported as the MPO units/joint fluid. A unit of MPO activity was defined as the conversion of 1 µmol of hydrogen peroxide to water in 1 min at 22° C.

## **2.8. Histopathological Analysis**

After sacrifice at 6h after zymosan-induced TMJ inflammatory hypernociception, the TMJ was excised. The specimens were fixed in 10 % neutral buffered formalin for 24 h, demineralized in 10 % EDTA, embedded in paraffin, and sectioned along the long axis of the TMJ. Sections of 5 µm, which included the condyle, articular cartilage, articular disc, synovial membrane, periarticular tissue, and the skeletal muscle tissue, were evaluated under light microscopy.

For the specimens processed for routine hematoxylin-eosin (H&E) staining, histological analysis considered a 0–4 score grade based on the cell influx in the synovial membrane (SM).

## **2.9. Immunohistochemistry for TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ and HO-1**

Immunohistochemistry for IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and HO-1 were performed using the streptavidin–biotin (Labeled Streptavidin Biotin—LSAB) method in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections (4 µm thick), mounted on glass slides previously prepared with an organosilane based adhesive (3-aminopropyltriethoxysilane). Briefly, it consisted of the following steps: the sections went through 2 baths in xylol, each lasting 10 min. After this, they were immersed in three passages of absolute alcohol, then washed in running water, and immediately passed through distilled water. After antigen retrieval, endogenous peroxidase was blocked (15 min) with 3 % (v/v) hydrogen peroxide, and the sections were washed in phosphate-buffered saline

(PBS). Sections were incubated overnight (4 °C) with a primary rabbit anti-TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  or HO-1 antibodies (ab13243, ABCAM®, England, UK), at a dilution of 1:200, and afterwards washed with a phosphate buffered saline solution, PBS (phosphate buffered saline). The slides were incubated with a secondary antibody LSAB Kit (DAKO®, Carpinteria, CA, EUA) for 10 min at ambient temperature. The slides were then incubated with a biotinylated goat anti-rabbit antibody diluted 1:400 in PBS-BSA. After washing, the slides were incubated with an avidin–biotin–horseradish peroxidase conjugate (Strep ABC complex, VECTASTAIN ABC Reagent and peroxidase substrate solution) for 30 min according to the VECTASTAIN protocol. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  or HO-1 were visualized with the chromogen 3,3'-diaminobenzidine (DAB) (DAKO®, Carpinteria, CA, EUA). Negative control sections were processed simultaneously as described above but with the first antibody being replaced by 5 % PBS-BSA. None of the negative controls showed TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , or HO-1 immunoreactivity. Counterstaining was performed with hematoxylin, and afterwards the specimens were dehydrated in alcohol and diaphanized in xylol. Positive values were assigned to all cells that exhibited brown staining in the cytoplasm, irrespective of the staining intensity.

## **2.10. TMJ periarticular tissue and trigeminal ganglion TNF- $\alpha$ and IL-1 $\beta$ ELISA assays**

TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  concentrations were determined in the TMJ periarticular tissue and trigeminal ganglion at 6 h after zymosan injection in rats that received 1 mg/kg AEL or vehicle (0.9 % sterile saline). TMJ periarticular tissue and trigeminal ganglion were removed and stored at -80° C. The material was homogenized in a solution of RIPA Lysis Buffer System (Santa Cruz Biotechnology, USA), and the supernatant was used to determine the cytokine levels were quantified by the following kits: TNF- $\alpha$ –Rat TNF-alpha/TNFSF1A Quantikine ELISA Kit (R&D Systems, catalog number RTA00) and IL-1 $\beta$ –Rat IL-1 beta/ IL-1F2 Quantikine ELISA Kit (R&D Systems, catalog number DY501) by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). All assays were carried out according to the manufacturer's instructions. Briefly, microtiter plates were coated overnight at room temperature (20-23° C) with an antibody capture against rat (4.0  $\mu$ g/mL) or IL-1 $\beta$  (0.8  $\mu$ g/mL). The plate was blocked by adding of Reagent Diluent to each well, incubated at room temperature for a minimum of 1 h. After blocking the plate, the samples and standard at various

dilutions were added and incubated at room temperature for 2 h. The plate was washed three times with buffer and of the Detection Antibody, diluted in Reagent Diluent with NGS 2 % (350 ng/mL) was added (100  $\mu$ L/well). After further incubation at room temperature for 2 h, the plate was washed and Streptavidin-HRP was added. The color reagent ( $H_2O_2$  and Tetramethylbenzidine; 100  $\mu$ L/well) was added 15 min later and the plate was incubated in the dark at room temperature for 15–20 min. The enzyme reaction was stopped with  $H_2SO_4$  and absorbance was measured at 450 nm. TNF- $\alpha$  or IL-1 $\beta$  concentrations were expressed as picograms/mL.

### **2.11. Evans Blue Extravasation Measurement**

In another sequence of experiments, AEL (1mg/kg) was administered to rats (n = 18) 30 min prior to zymosan. 30 min before euthanasia, Evans Blue 2.5% (5mg/kg, i.v.) was administered to assess plasma extravasation. Immediately after the extraction, the periarticular tissue was weighed and placed in 2mL of formaldehyde overnight. The supernatant (100  $\mu$ L) was extracted, and the absorbance at 630 nm was determined in spectrophotometer. The concentration was determined by comparison to a standard curve of known amounts of Evans blue dye in the extraction solution, which was assessed within the same assay. The amount of Evans blue dye ( $\mu$ g) was then calculated per mg of exudates.

### **2.12. Pharmacological Modulation**

Thirty minutes before injection with zymosan, rats were pretreated (0.1 mL/100 g body weight) with AEL (0.01, 0.1 or 1 mg/kg) by intravenous (i.v.) injection or 0.9 % sterile saline. Animals (sham group) received the same volume of 0.9 % sterile saline. A positive control group of rats was pretreated (s.c.) with indomethacin (5 mg/kg) 1 h before zymosan injection. The animals were euthanized under anesthesia at 6 h after zymosan-induced inflammatory hypernociception and inflammatory parameters (total cell count and myeloperoxidase assay activity) were evaluated.

To analyze the possible effect of HO-1 and NO pathway on anti-nociceptive and anti-inflammatory efficacy of *Abelmoschus esculentus* lectin in the model of zymosan-induced TMJ inflammatory hypernociception in the rat, another series of experiments was performed. Animals were pretreated (s.c.) with ZnPP-IX (3 mg/kg), a specific HO-1 inhibitor, or with aminoguanidine (30 mg/kg) (i.p.) a selective inhibitor of nitric oxide synthase (iNOS), alone or followed by an injection

(i.v.) of AEL (1 mg/kg) 30 min later. After 30 min, zymosan (2 mg) was injected (i.art.), and on the 4<sup>th</sup> h inflammatory hypernociception in the TMJ was evaluated as described above and inflammatory parameters (total cell count and myeloperoxidase assay activity) were evaluated.

#### **2.14. Statistical Analysis**

The data are presented as the means±S.E.M. or medians, when appropriate. Differences between means were compared using a one-way ANOVA followed by the Bonferroni test. The Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test was used to compare medians. A probability value of  $p < 0.05$  indicated significant differences.

### **3. Results**

#### **3.1. AEL reduces mechanical hypernociception, leukocyte cell count, MPO activity and Evans blue extravasation measurement on zymosan-induced TMJ inflammatory hypernociception in rats**

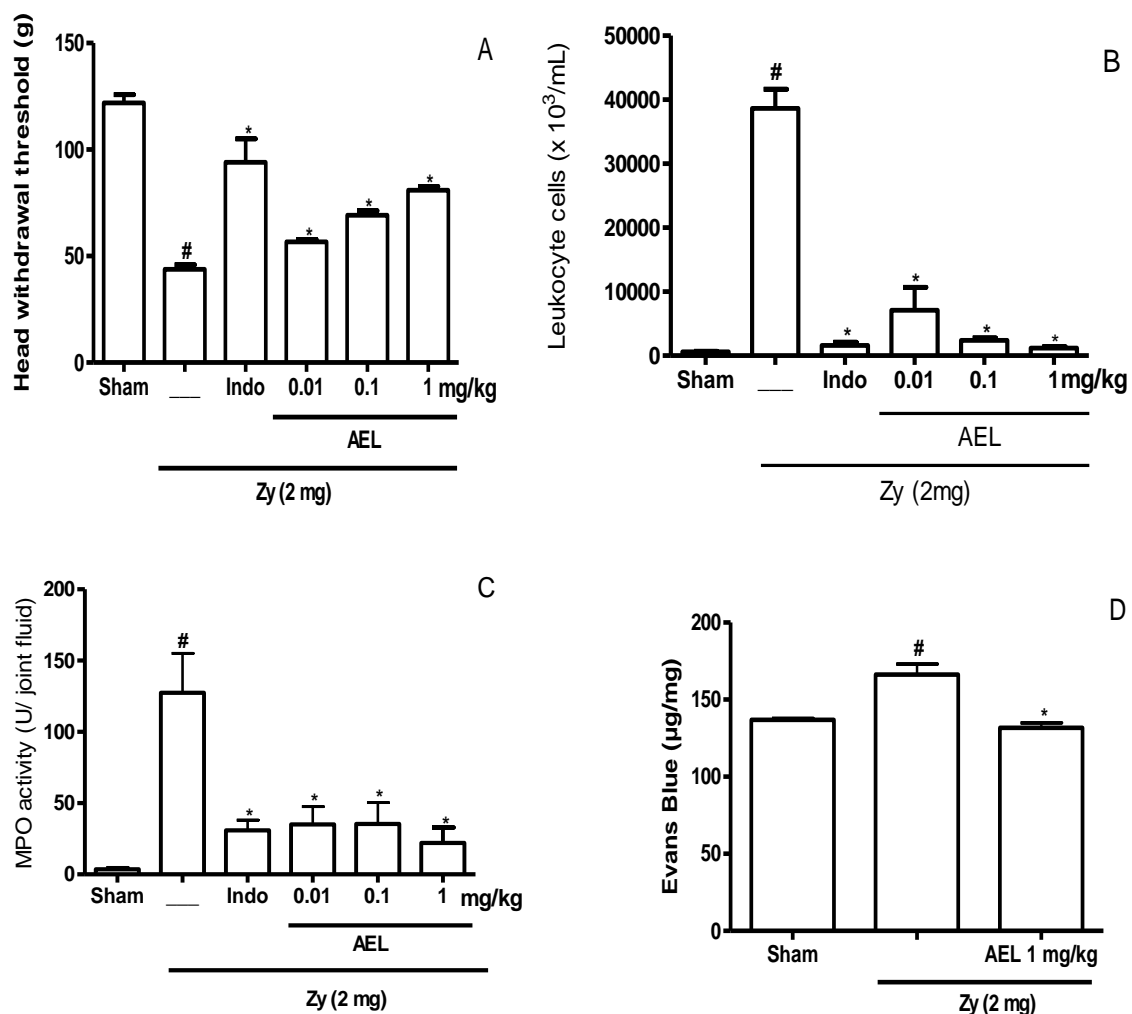
The i.art. injection of zymosan (2 mg/art., 40  $\mu$ L) elicited ( $p < 0.05$ ) a mechanical hypernociception response ( $43.8 \pm 2.2$  g) compared to the sham group ( $122.0 \pm 3.8$  g) at 4 h after the inflammatory stimulus, as measured by a clear decrease in the mechanical threshold for head withdrawal. The i.v. treatment with AEL (0.01, 0.1 or 1 mg/kg), administered 30 min prior to zymosan into the left TMJ of the rats, caused a reduction in mechanical hypernociception at all tested doses by ( $56.7 \pm 1.1$  g), ( $69.1 \pm 2.1$  g) and ( $81 \pm 1.7$  g), respectively, ( $p < 0.05$ ), as measured at 4 h after zymosan injection. Indomethacin (5 mg/kg, s.c.) also produced an antinociception effect ( $94.1 \pm 10.9$  g,  $p < 0.05$ ) (Fig. 1A).

Additionally, the i.art. injection of zymosan into the rat left TMJ resulted in a significant increase in the number of polymorphonuclear cells ( $41967 \pm 3563$  mm<sup>3</sup>) from the TMJ synovial lavage at 6 h, compared to the sham group ( $615.8 \pm 66.2$  cells/mm<sup>3</sup>). Pretreatment of rats with AEL (0.01, 0.1 or 1 mg/kg, i.v.) decreased ( $p < 0.05$ ) the leukocyte cell count from the TMJ synovial lavage by ( $7083 \pm 3584$  cells/mm<sup>3</sup>), ( $2413 \pm 354.2$  cells/mm<sup>3</sup>) and ( $1183 \pm 219.3$  cells/mm<sup>3</sup>), respectively, in comparison to the zymosan group (Fig. 1B). Indomethacin resulted in ( $1610 \pm 490.6$  cells/mm<sup>3</sup>) inhibition ( $p < 0.05$ ) of the leukocyte number in the synovial lavage. The MPO activity also decreased in the TMJ synovial lavage at all doses tested



( $35.1 \pm 12.4$  U/joint fluid), ( $22.0 \pm 8.1$  U/joint fluid) and ( $22.1 \pm 10.7$  U/joint fluid), respectively in comparison to the zymosan group ( $127.5 \pm 27.6$  U/joint fluid) (Fig. 1C).

These changes were accompanied by plasma extravasation that occurred in the TMJ during the 6 h, which was certified by of Evans blue dye extravasation. The i.art. injection of zymosan resulted in a significant increase in Evans Blue extravasation measurement ( $166.3 \pm 6.7$   $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) in comparison to the sham group ( $136.9 \pm 1.0$   $\mu\text{g}/\text{mg}$ ). Pretreatment of rats with AEL 1 mg/kg, i.v. decreased ( $p < 0.05$ ) Evans Blue extravasation measurement ( $131.7 \pm 3.1$   $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) in comparison to the zymosan group (Fig. 1D).



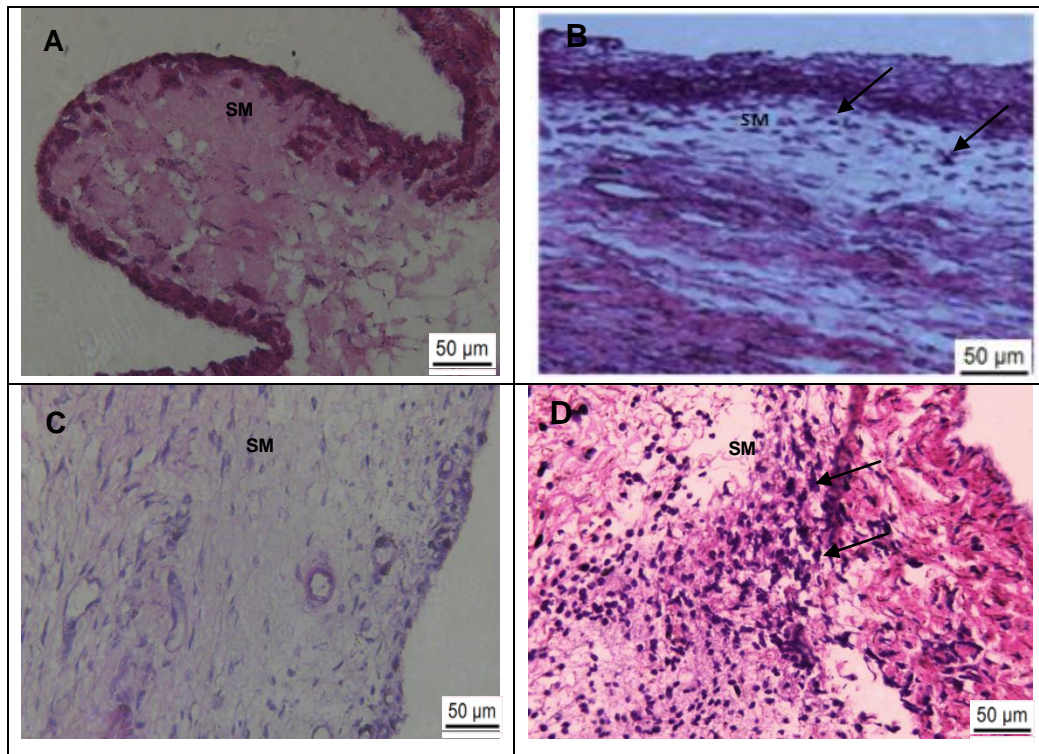
**Figure 1. Efficacy of *Abelmoschus esculentus* lectin on zymosan-induced TMJ inflammatory hypernociception.** Zymosan (2 mg; 40  $\mu\text{L}$ ) or saline (sham group) was injected i.art. into the left TMJ of the rat. *Abelmoschus esculentus* (0.01, 0.1 or 1 mg/kg) was injected (i.v.) 30 min prior to zymosan (i.art.). Also, indomethacin (5 mg/kg, s.c.) was injected 1 h prior to zymosan (i.art.). **(A) Head withdrawal threshold in *Abelmoschus esculentus* lectin-treated animals:** The i.v. pretreatment of rats with AEL (0.01, 0.1 or 1 mg/kg), administered 30 min prior to zymosan into the rat left TMJ, caused a reduction in mechanical hypernociception at all tested doses by ( $56.7 \pm 1.1$  g), ( $69.1 \pm 2.1$  g) and ( $81 \pm 1.7$  g), respectively, in comparison with the zymosan group ( $43.8 \pm 2.2$  g). **(B) Leukocyte**

**counting in *Abelmoschus esculentus* lectin-treated animals:** Pretreatment of rats with AEL (0.01, 0.1 or 1 mg/kg, i.v.) decreased ( $p < 0.05$ ), the leukocyte cell count from the TMJ synovial lavage by ( $7083 \pm 3584$  cells/mm<sup>3</sup>), ( $2413 \pm 354.2$  cells/mm<sup>3</sup>) and ( $1183 \pm 219.3$  cells/mm<sup>3</sup>), respectively, in comparison with the zymosan group ( $41967 \pm 3563$  cells/mm<sup>3</sup>). **(C) MPO activity in *Abelmoschus esculentus* lectin-treated animals.** Pretreatment of rats with AEL 1mg/kg, i.v. the MPO activity also decreased in the TMJ synovial lavage at all doses tested ( $35.1 \pm 12.4$  U/joint fluid), ( $22.0 \pm 8.1$  U/joint fluid) and ( $22.1 \pm 10.7$  U/joint fluid), respectively, in comparison with the zymosan group ( $127.5 \pm 27.6$  U/joint fluid). **(D) Evans Blue extravasation measurement in *Abelmoschus esculentus* lectin - treated animals.** Pretreatment of rats with AEL 1mg/kg, i.v. decreased ( $p < 0.05$ ) Evans Blue extravasation measurement ( $131.7 \pm 3.1$  µg/mg) in comparison with the zymosan group ( $166.3 \pm 6.7$  µg/mg). Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM of 6 mice for each group. # $p < 0.05$  indicates a significant difference from the sham group, \* $p < 0.05$  indicates a significant difference from the zymosan group (ANOVA, Bonferroni).

### 3.2. AEL reverses tissue alteration in the zymosan-inflamed TMJ as assessed by H & E staining

Six hours after zymosan-induced TMJ inflammatory hypernociception, an inflammatory cell influx was observed in the synovial membrane (SM) (Fig. 2B) compared to the sham group where this finding is not present (Fig. 2A). The cell types were predominantly neutrophils, which characterizes acute inflammation. Edema was also observed in the synovium (Fig. 2B). Table 1 shows the scores attributed to TMJ's histopathological analysis and compares the values between the TMJs of sham, zymosan and AEL groups.

A significant ( $p < 0.05$ ) increase in the inflammatory parameters was observed in the zymosan group compared to sham group. Only AEL (1 mg/kg) reduced the inflammatory parameters with a lower inflammatory cell influx in the SM. In the photomicrography of TMJ treated with AEL (1 mg/kg), it is observed the reduction of inflammatory cells and edema in the SM (Fig. 2C).



**Figure 2. Photomicrographs of the histopathological analysis of TMJs:** (A) sham group TMJ (400 $\times$ ); (B) TMJ inflammatory hypernociception on zymosan-induced (400 $\times$ ) showing inflammatory cell influx in the synovial membrane; (C) TMJ of rats pretreated (i.v.) AEL (1 mg/kg) and injected (i.art.) with zymosan 2 mg (400 $\times$ ) showing reduction of the inflammatory parameters with a lower inflammatory cell influx in the synovial membrane; and (D) TMJ of rats pretreated (s.c.) with ZnPP-IX (3 mg/kg), a specific HO-1 inhibitor, followed by an injection (i.v) of AEL (1 mg/kg) and injected (i.art.) with zymosan 2 mg (400 $\times$ ). ZnPP-IX reverted the effects of AEL (1 mg/kg) on the TMJ histopathological analysis (H&E) in the synovial membrane. SM, synovial membrane. Haematoxylin and eosin (H&E) staining. Black arrows indicate neutrophils.

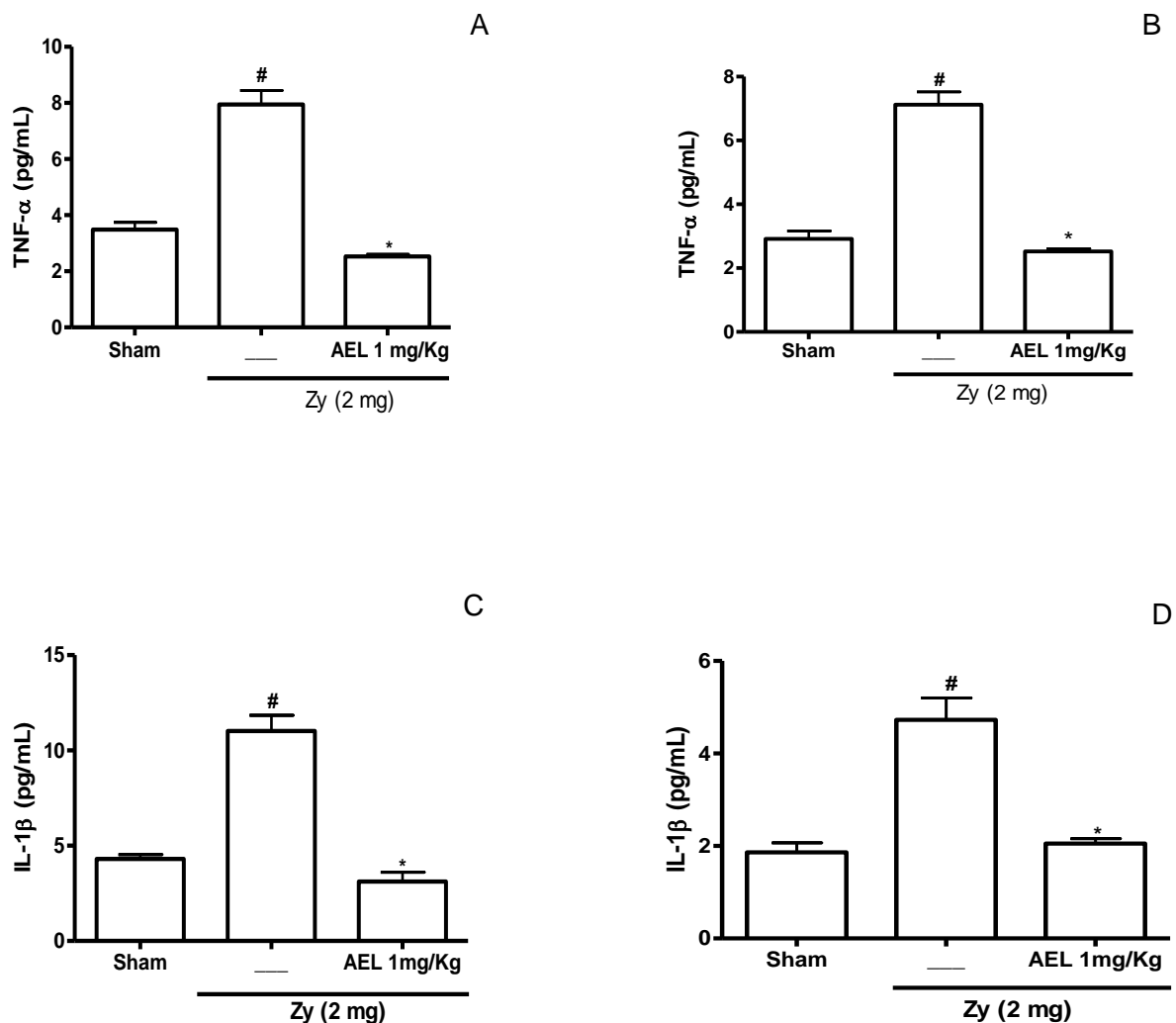
**Table 1. Histopathological analysis of the temporomandibular joint in zymosan-induced inflammatory hypernociception: The effect of *Abelmoschus esculentus* lectin and its effect in the presence of ZnPP-XI.**

<b>Groups</b>	<b>Cell influx in the synovial membrane</b>	<b>Cell influx in the periarticular tissue</b>	<b>Cell influx in the muscular tissue</b>
<b>Sham</b>	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
<b>Zymosan (Zy)</b>	3 (1-4) <sup>#</sup>	4 (2-4)	2.5 (2-3)
<b>Zy + Indomethacin</b>	0 (0-1) <sup>*</sup>	0 (0-1) <sup>*</sup>	0 (0-1) <sup>*</sup>
<b>Zy + AEL (0.01 mg/kg)</b>	1 (0-2)	3 (2-3)	2 (1-3)
<b>Zy + AEL (0.1 mg/kg)</b>	2 (1-3)	3 (1-4)	2 (1-3)
<b>Zy + AEL (1 mg/kg)</b>	0.5 (0-1) <sup>*</sup>	2.5 (1-4)	1.5 (0-3)
<b>Zy + ZnPP-IX + AEL (1 mg/kg)</b>	3 (2-4) <sup>&amp;</sup>	4 (3-4)	2 (2-3)

Zymosan (2 mg; 40  $\mu$ L) or saline was injected i.art. into the left TMJ of the rat. *Abelmoschus esculentus* lectin (0.01, 0.1 or 1mg/kg) was administered (iv) 30 min prior to zymosan (i.art.). The TMJs were removed at the 6<sup>th</sup> h after injection zymosan (i.art.) or saline. After fixation in 10 % formalin, decalcification with formic acid 5 %, TMJs were embedded in paraffin, followed by staining with hematoxylin-eosin (H & E). Semi-quantitative analysis of the slides was done by evaluating the following histopathological criteria: Inflammatory cell influx in the synovial membrane (SM), inflammatory cell influx into the periarticular tissue and inflammatory cell influx in skeletal muscle tissue. Assigns Scores were 0-4, as follows: 0 - absent; 1 - low; 2 - mild; 3 - moderate; 4 - severe. Data represent median and range of 6 TMJs per group. <sup>#</sup>p<0.05 compared to sham group, <sup>\*</sup>p<0.05 compared to group Zy, <sup>&</sup>p<0.05 compared to group AEL (1 mg/kg). (Kruskal-Wallis, Dunn's).

### 3.3 AEL decreases TNF- $\alpha$ and IL-1 $\beta$ ELISA assays on TMJ tissue and trigeminal ganglion in zymosan-induced TMJ inflammatory hypernociception in rats

The intra-articular (i.art.) 2 mg injection of zymosan resulted in a significant increase in TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  levels in both TMJ tissue (Fig. 3A and 3C) and trigeminal ganglion (Fig. 3B and 3D) compared to sham group. AEL (1 mg/kg) also reduced TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  levels in both TMJ tissue ( $2.52\pm 0.07$ ) ( $3.11\pm 0.49$ ) and trigeminal ganglion ( $2.52\pm 0.09$ ) ( $1.55\pm 0.34$ ), respectively, when compared to zymosan group ( $7.94\pm 0.49$ ,  $11.01\pm 0.83$  and  $7.12\pm 0.40$ ,  $4.72\pm 0.47$ , respectively).



**Figure 3. Effect of *Abemoschus esculentus* lectin on the levels of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in the TMJ periarticular tissue (A) and (C) and in the trigeminal ganglion (B) and (D) on zymosan-induced TMJ inflammatory hypernociception.** Zymosan (2 mg; 40  $\mu$ L) or saline was injected i.art. into the left TMJ of the rat. *Abelmoschus esculentus* lectin (1 mg/kg) was injected (i.v.) 30 min prior to zymosan (i.art.). The IL-1 $\beta$  was performed by ELISA using samples of TMJ periarticular tissue obtained at the 6<sup>th</sup> hour after injection of Zy (i.art.). AEL (1 mg/kg) also reduced TNF- $\alpha$  (Fig. 3A) and IL-1 $\beta$  (Fig. 3C) levels in both joint tissue ( $2.52\pm 0.07$ ) ( $3.11\pm 0.49$ ) and trigeminal ganglion ( $2.52\pm 0.09$ ) ( $1.55\pm 0.34$ ) (Fig.3B and Fig. 3D), when compared to zymosan group ( $7.94\pm 0.49$   $11.01\pm 0.83$  and  $7.12\pm 0.40$

4.72±0.47, respectively). The data represent the mean ± SEM (n = 6) #p<0.05 indicates a significant difference from the sham group, \*p<0.05 indicates a significant difference from the zymosan group (ANOVA, Bonferroni).

### 3.4 Effect of zinc protoporphyrin IX (ZnPP IX), a specific HO-1 inhibitor, on the AEL efficacy on the zymosan-induced TMJ inflammatory hypernociception

To investigate the role of HO-1 activity on the anti-inflammatory effect of AEL (1 mg/kg), the animals were pretreated (s.c.) with ZnPP-IX (3 mg/kg), a specific HO-1 inhibitor. The effects of *Abelmoschus esculentus* lectin on the zymosan-induced TMJ inflammatory hypernociception (Fig. 4A), inflammation polymorphonuclear cells counts (Fig. 4B) and MPO activity in the TMJ synovial lavage (Fig. 4C) were not observed in the presence of ZnPP-IX (3 mg/kg). Further, the effects of AEL (1 mg/kg) on the TMJ's histopathological analysis (H&E) was not observed in the presence of ZnPP-IX (3 mg/kg) (table 1) (Fig. 2D).

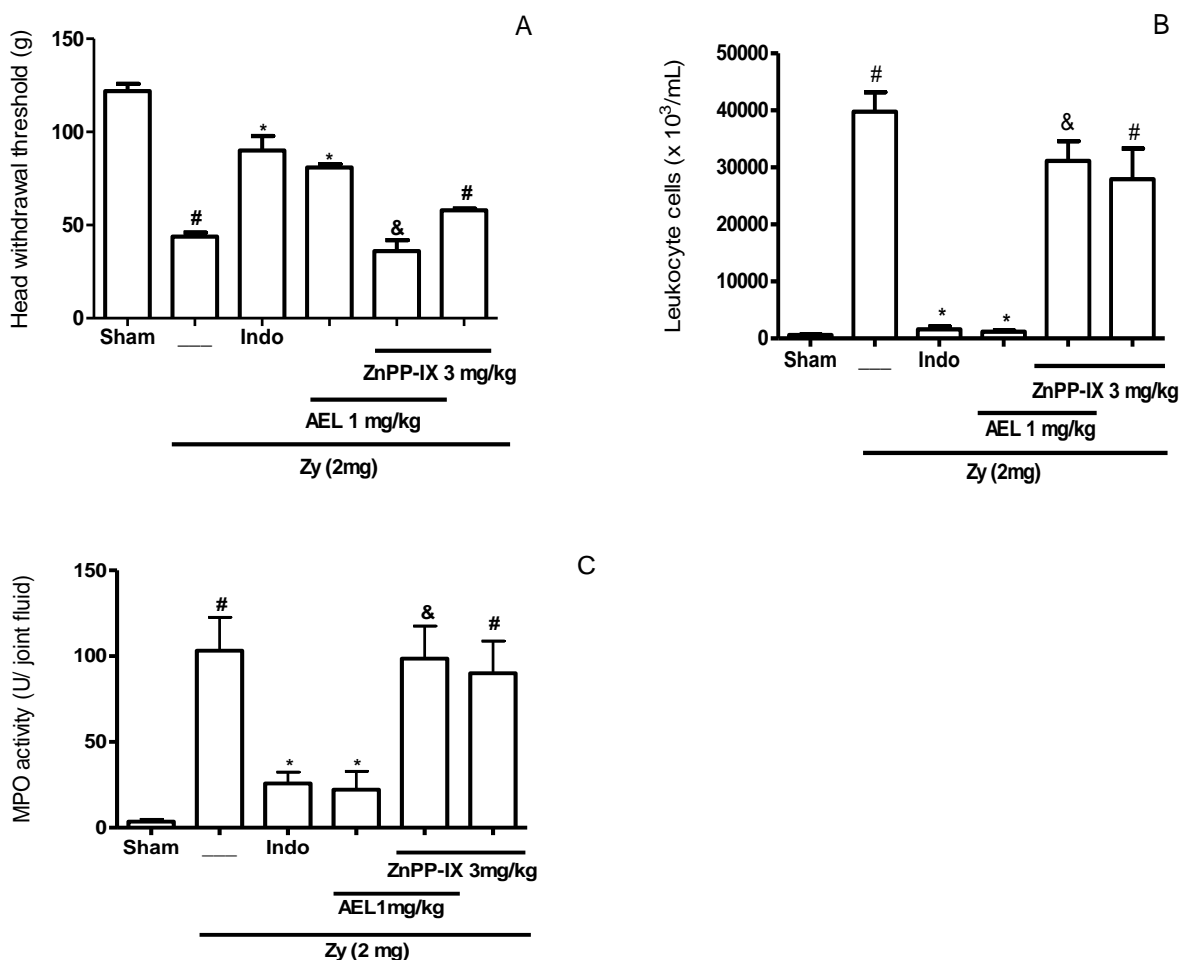
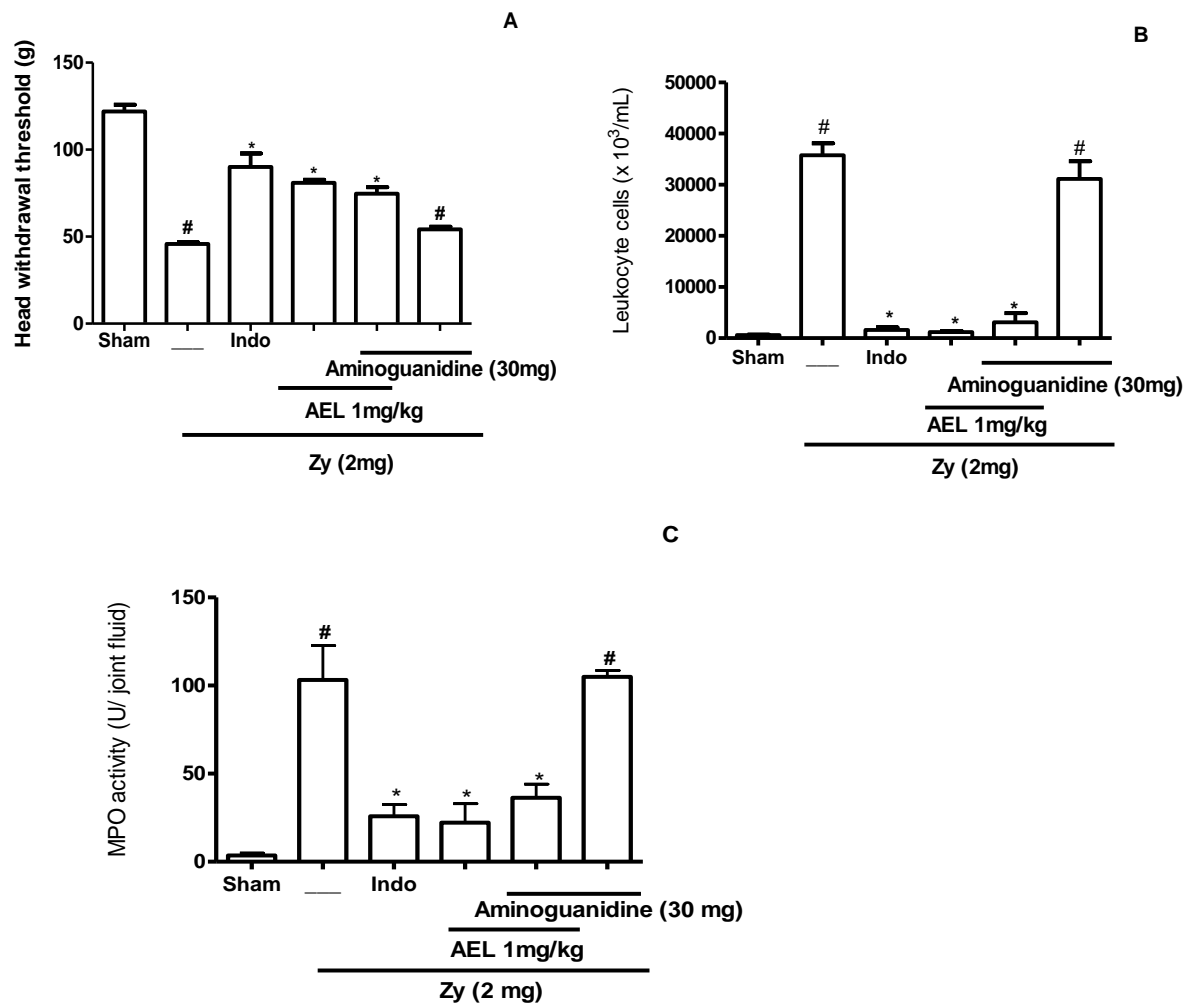


Figure 4. Effect of zinc protoporphyrin IX (ZnPP-IX), a specific HO-1 inhibitor, in the *Abelmoschus esculentus* lectin effect on zymosan-induced TMJ inflammatory

**hypernociception.** Animals were pretreated (s.c.) with ZnPP-IX (3 mg/kg) alone or followed by an injection (i.v.) of AEL (1 mg/kg) 30 min later. After 1 h, zymosan (2 mg) was injected (i.art.). Also, indomethacin (5 mg/kg, s.c.) was injected 1 h prior to zymosan i.art. injection. **(A) Head withdrawal threshold in ZnPP-IX + *Abelmoschus esculentus* lectin-treated animals:** The effects of pretreatment of rats with AEL (1 mg/kg i.v.) on the mechanical hyper-nociception were not observed in the presence of ZnPP-IX (3 mg/kg). **(B) Leukocyte counting in ZnPP IX + *Abelmoschus esculentus* lectin-treated animals:** The effects of pretreatment of rats with AEL (1 mg/kg i.v.) on the leukocyte cell count from the TMJ synovial lavage were not observed in the presence of ZnPP-IX (3 mg/kg). **(C) Myeloperoxidase (MPO) activity from TMJ synovial lavage in ZnPP-IX + *Abelmoschus esculentus* lectin-treated animals:** The effects of pretreatment of rats with AEL (1 mg/kg i.v.) on the MPO activity in the TMJ synovial lavage were not observed in the presence of ZnPP-IX (3 mg/kg). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM of 6 mice for each group. #p<0.05 indicates a significant difference from the sham group, \*p<0.05 indicates a significant difference from the zymosan group, &p<0.05 indicates a significant difference from AEL group (ANOVA, Bonferroni).

### **3.5 Effect of aminoguanidine a selective inhibitor of nitric oxide synthase (iNOS), on the AEL efficacy on the zymosan-induced TMJ inflammatory hypernociception**

To investigate the possible role of the NO in the antinociceptive and anti-inflammatory effects of AEL, the rats were pretreated with aminoguanidine (30 mg/kg) (i.p.) a selective inhibitor of nitric oxide synthase (iNOS). It was observed that the anti-nociceptive and anti-inflammatory effects of the AEL (1 mg/kg, i.v.) on the zymosan-induced inflammatory hypernociception in the rat TMJ model were not inhibited in the presence of aminoguanidine, a result that was further confirmed by inflammatory hypernociception, cell Counting and MPO activity measurement (Fig. 5A, 5B and 5C).



**Figure 5. Effect of aminoguanidine, a specific inhibitor of nitric oxide synthase (iNOS), in the *Abelmoschus esculentus* lectin effect on zymosan-induced TMJ inflammatory hypernociception.** Animals were pretreated (i.p.) with aminoguanidine (30 mg/kg) alone or followed by an injection (i.v.) of AEL (1 mg/kg) 30 min later. After 30 min, zymosan (2 mg) was injected (i.art.). Also, indomethacin (5 mg/kg, s.c.) was injected 1 h prior to zymosan i.art. injection. **(A) Head withdrawal threshold in aminoguanidine + *Abelmoschus esculentus* lectin-treated animals:** It was observed the effects of pretreatment of rats with AEL (1mg/kg i.v.) on the mechanical hypernociception were not inhibited in the presence of aminoguanidine. **(B) Leukocyte counting in aminoguanidine + *Abelmoschus esculentus* lectin-treated animals:** It was observed the effects of pretreatment of rats with AEL (1 mg/kg i.v.) on the the leukocyte cell count from the TMJ synovial lavage were not inhibited in the presence of aminoguanidine. **(C) Myeloperoxidase (MPO) activity from TMJ synovial lavage in aminoguanidine + *Abelmoschus esculentus* lectin-treated animals:** It was observed the effects of pretreatment of rats with AEL (1mg/kg i.v.) on the MPO activity in the TMJ synovial lavage were not inhibited in the presence of aminoguanidine. Data are expressed as means  $\pm$  SEM of 6 mice for each group. # $p < 0.05$  indicates a significant difference from the sham group, \* $p < 0.05$  indicates a significant difference from the zymosan group, (ANOVA, Bonferroni).



### 3.6 Immunohistochemical analysis

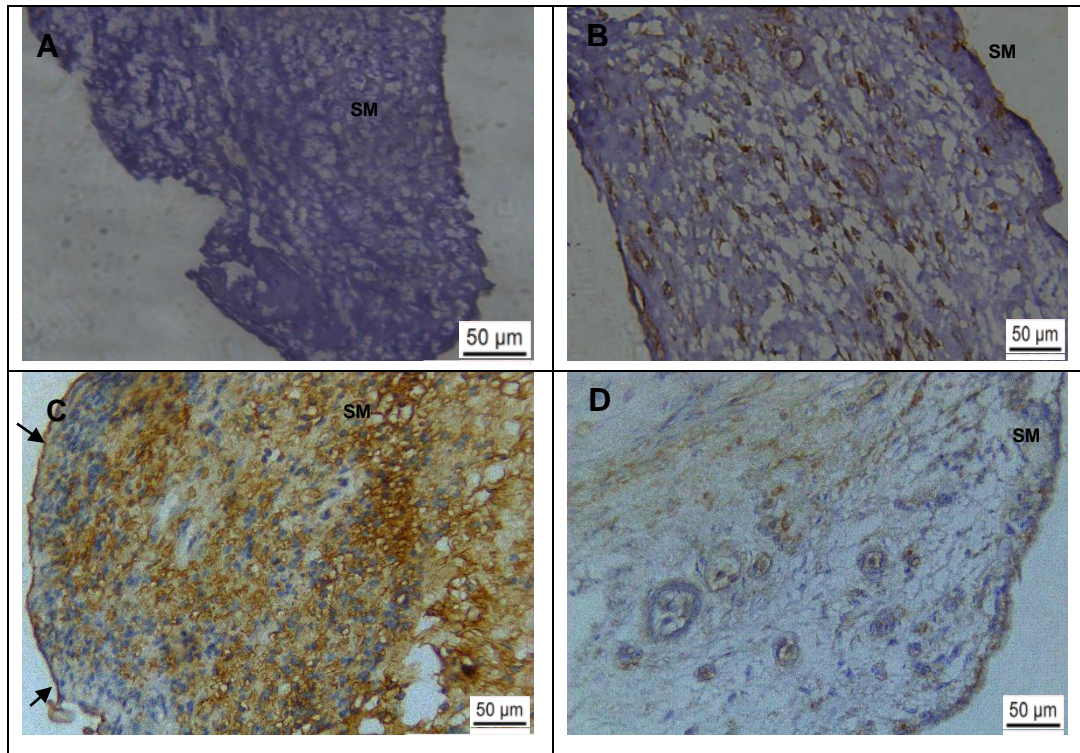
An immunohistochemical analysis for TNF- $\alpha$  showed an increase in TNF- $\alpha$  on inflammatory cells and synoviocytes, which was characterized by brown-colored cells in TMJ rats injected with zymosan (Fig. 6C) compared to sham group (Fig. 6B), which exhibited only a light expression of TNF- $\alpha$  on endothelial cells, fibroblasts and macrophages.

An immunohistochemical analysis for IL-1  $\beta$  showed an increase in IL-1  $\beta$  on synoviocytes, inflammatory cells and fibroblasts, which was characterized by brown-colored cells in TMJ rats injected with zymosan (Fig. 7C) when compared to the sham group (Fig. 7B), an intense immunostaining of, which exhibited only a light expression of IL-1  $\beta$  only on connective tissue.

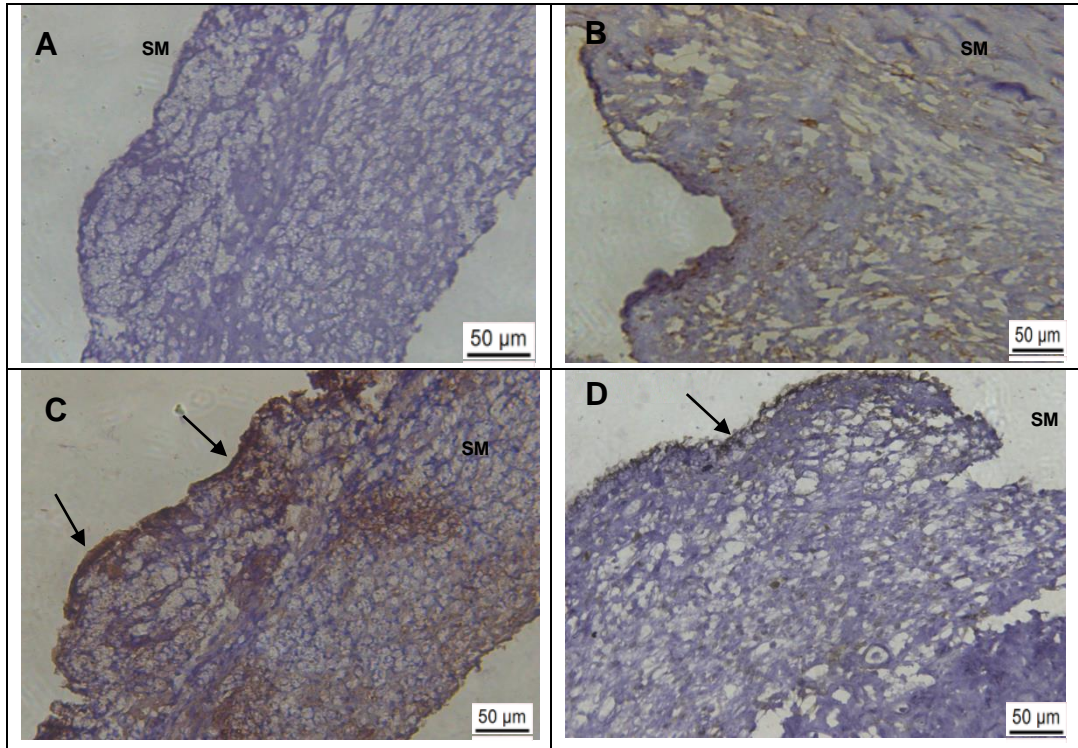
An immunohistochemical analysis for HO-1 showed a light immunostaining in HO-1 on synoviocytes, inflammatory cells and fibroblasts, which was characterized by brown-colored cells in TMJ rats injected with zymosan (Fig. 8C), similar to sham group (Fig. 8B), which exhibited only a light expression of HO-1 but only on connective tissue. The negative control group sections were composed of TMJ of rats injected with zymosan (i.art.), but that did not receive the primary antibodies anti-TNF- $\alpha$ , anti-IL-1 $\beta$  or anti-HO-1 antibodies. None of the negative controls showed immunoreactivity (Fig. 6A, 7A and 8A).

A significant decrease in TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  expression was observed in the AEL-treated group compared to the zymosan group since the immunohistochemical analysis did not reveal significant expression of this pro-inflammatory cytokine in the synovial membrane or in the neutrophils. These profiles suggest an immunocellular response by AEL during the acute phase. These staining was reduced in the AEL group similar to the level of the sham controls (Fig. 6D and 7D).

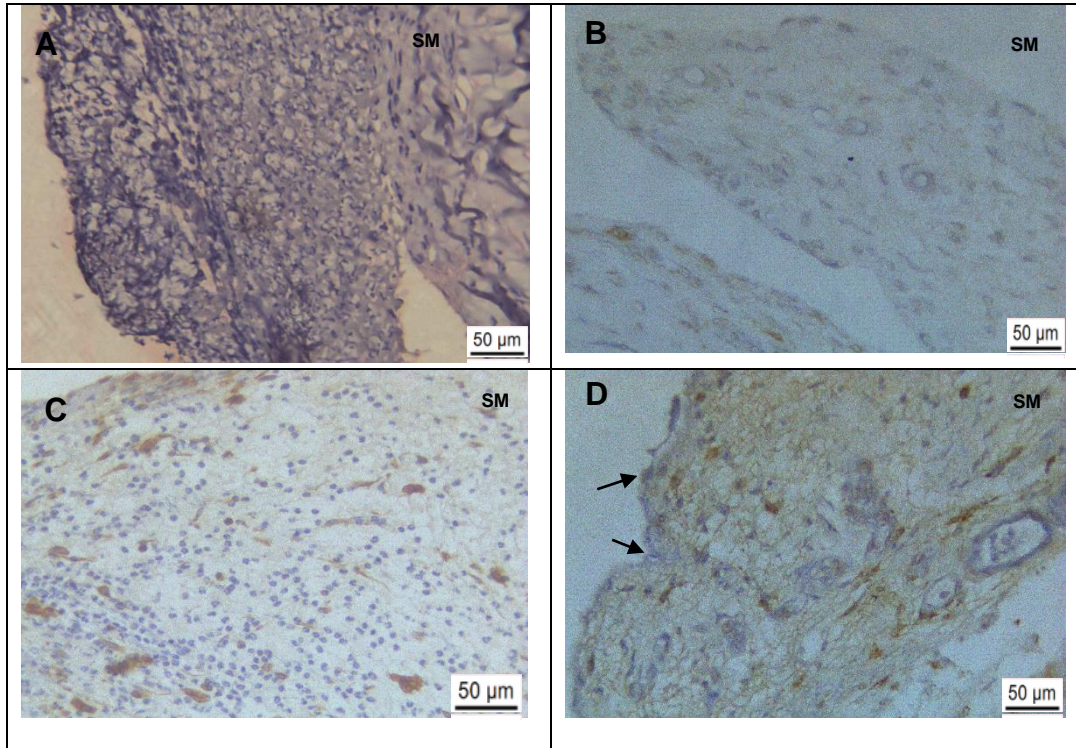
Finally, immunohistochemical analysis for HO-1 showed an increase in HO-1 expression that was characterized by brown-colored cells in the synovial membrane of the zymosan-induced TMJ inflammatory hypernociception treated with AEL (1 mg/kg) (Fig 8D). The cell types that expressed HO-1 were the synovial and connective tissue cells.



**Figure 6.** Immunohistochemistry analysis for TNF- $\alpha$  in inflammatory hypernociception of zymosan-induced TMJ in rats. (A) Negative control sections (absence of anti-TNF- $\alpha$  antibody) from zymosan groups (400 $\times$ ). (B) The synovial membrane from the sham group showed light expression of TNF- $\alpha$ . (C) The synovial membrane from the zymosan group (2 mg/art.) with an intense TNF- $\alpha$  reaction (400 $\times$ ). (D) AEL (1 mg/kg, i.v.) showed light expression of TNF- $\alpha$  in the synovial membrane after inflammatory hypernociception of zymosan-induced (400 $\times$ ). Black arrows indicate synoviocytes.



**Figure 7.** Immunohistochemistry analysis for IL-1 $\beta$  in inflammatory hypernociception of zymosan-induced TMJ in rats. (A) Negative control sections (absence of the anti- IL-1 $\beta$  antibody) from zymosan group (400 $\times$ ). (B) The synovial membrane of the sham group revealed light expression of IL-1 $\beta$  (400 $\times$ ). (C) The synovial membrane of the zymosan group (2 mg/art.) with an intense IL-1 $\beta$  reaction (400 $\times$ ). (D) AEL (1 mg/kg, i.v.) showed light expression of IL-1 $\beta$  in the synovial membrane after inflammatory hypernociception of zymosan-induced (400 $\times$ ). Black arrows indicate synoviocytes.



**Figure 8.** Immunohistochemistry analysis for HO-1 in inflammatory hypernociception of zymosan-induced TMJ in rats. (A) Negative control sections (absence of the anti- HO-1 antibody) from arthritic rats (400x). (B) Synovial membrane from the sham group revealed the basal constitutive levels of HO-1 (400x). (C) Synovial membrane of the zymosan group (2 mg/art.), intense expression of HO-1 (400x). (D) AEL (1 mg/kg, i.v.) showed an increase on expression of HO-1 in the synovial membrane after inflammatory hypernociception of zymosan-induced (400x). Black arrows indicate synoviocytes.

#### 4. Discussion

In this work, we demonstrated the antinociceptive and anti-inflammatory efficacy of a lectin from *Abelmoschus esculentus* in the model of zymosan-induced TMJ inflammatory hypernociception in rats. We also found evidence that, at least in part, the antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Abelmoschus esculentus* lectin in zymosan-induced TMJ inflammatory hypernociception depends on the integrity of the HO-1 pathway as well on TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  levels, as there was a reduction of these cytokines concentrations in the TMJ periarticular tissue and in the trigeminal ganglion. However, it did not exert its actions through the NO pathway.

Zymosan has been used as a pro-inflammatory agent for some time (Gadó and Gigler, 1991). Acute rat knee joint zymosan arthritis is characterized by an increase in vascular permeability, cell migration, and pain. Later, a progressive synovitis occurs with mononuclear cell infiltration and a fibroblast reaction (Keystone *et al.*, 1977; Rocha *et al.*, 1999). Our group has also demonstrated articular cartilage and subchondral bone degradation during the chronic stages of zymosan-induced arthritis in the rat knee joint (Bezerra *et al.*, 2004). To our knowledge, we performed the first demonstration of a zymosan-induced arthritis in the TMJ describing the histopathological inflammatory parameters involving the articular and periarticular tissues in an experimental TMJ arthritis (Chaves *et al.*, 2011).

Our studies with the specific AEL showed its antinociceptive, anti-tumor and anti-inflammatory (Monte *et al.*, 2013; Soares *et al.*, 2012). These studies did not demonstrate any cytotoxicity on erythrocytes (Soares *et al.*, 2012). Sabitha *et al.* (2011) and Kumar *et al.* (2009) showed the safety of AEL in acute and chronic toxicity testing, and there were not recorded in these works deleterious mortality of animals (mice) after administration of high doses. These results, added to the empirical use by the community, suggest safety for use of AEL (Maganha *et al.*, 2010).

To our knowledge this is the first demonstration that a lectin from a plant is able to exert some antinociceptive and anti-inflammatory effect on the TMJ pain, and specially that *Abelmoschus esculentus* lectin is able to exert antinociceptive and anti-inflammatory effects on zymosan-induced TMJ hypernociception in rats.

In the present study the intra-articular (i.art.) 2 mg injection of zymosan decreased the head withdrawal threshold, which was partially increased by AEL treatment. Regarding the inflammatory parameters, AEL administration decreased the number of polymorphonuclear cells which was certified by the decrease of MPO activity in the synovial lavage. Pretreatment with AEL was still able to reduce extravasation of Evans blue in synovial exudates compared to the zymosan. Further, the TMJ's histopathological analysis from rats treated with AEL correlated to the decrease in both leukocyte influx and MPO activity, since this treatment reduced the inflammatory parameters to a normal status with a lower inflammatory cell influx in the synovial membrane. These data are in accordance with our previous results showing that AEL has antinociceptive and anti-inflammatory functions in classical models of nociception in mice and acute inflammation in rats (Soares *et al.*, 2012).

To confirm the AEL antinociceptive and anti-inflammatory effects, our results demonstrate that pretreatment with AEL was able to reduce TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  levels in the TMJ periarticular tissue. To corroborate that, the immunohistochemical analyses showed a significant decrease in TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  expression in synovial cells and inflammatory cells of the TMJ of the AEL treated groups of zymosan-induced TMJ inflammatory hypernociception.

The cytokines are a class of signaling proteins and glycoproteins that, such as hormones and neurotransmitters, are used extensively in cellular communication (Davis, 2012; Gunson *et al.*, 2012). They have emerged as the major controlling the degradation of joint tissue in osteoarthritis and models of inflammatory arthritis in humans (Cao-Xin *et al.*, 2015; Piya *et al.*, 2015). TNF $\alpha$  has an enormously detrimental effect on bone and cartilage (Gunson *et al.*, 2012). Animal models have shown that induction of IL-1 $\beta$  expression in the TMJ adult mice leads to the pathology development and pain in joints (Oakley and Vieira, 2008). In TMJ, a positive correlation was found between cytokines in synovial fluid and osteoarthritis. It has been suggested that the presence of IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$  in the synovial fluid affect the treatment outcome of patients with osteoarthritis (Hamada *et al.* 2008).

According to Gondim *et al.* (2012), electroacupuncture inhibited zymosan-induced TMJ inflammatory hypernociception, as well as neutrophil migration, vascular permeability, and TNF- $\alpha$  levels in synovial fluid. Because it has been largely demonstrated that cytokines play an important role in inflammatory hyper-nociception (Ritter *et al.*, 2014), our results suggested that AEL efficacy in zymosan-induced TMJ

inflammatory hyper-nociception might be related, at least in part, to TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  inhibition. As well as shown by Rivanor *et al.* (2014), which demonstrated the antinociceptive and anti-inflammatory efficacy of lectin of the green seaweed *Caulerpa cupressoides* (CcL) in a model of zymosan-induced TMJ inflammatory hypernociception in rats, our study strongly suggests that the efficacy of AEL, similar to CcL, involves inhibition of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  production.

Others authors have also demonstrated anti-inflammatory effects of lectins showing the modulation of this effect by inhibiting TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  levels in classical models of nociception and acute inflammation in vivo (Napimoga *et al.*, 2007; Nunes *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2010; Leite *et al.*, 2012; Araújo *et al.*, 2013).

The resolution of the inflammatory response during inflammatory hyper-nociception might be attributed to the inhibition of pro-inflammatory cytokines, such TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ . These two factors are assumed to be the most important cytokines in TMJ disorders (Nordahl *et al.*, 2000). In fact, it seems that these cytokines induce the production of metalloproteinases that irreversibly degrade the extracellular matrix components (Suzuki *et al.*, 2002), including articular cartilage, as well as causing bone destruction and cell proliferation (Vicente *et al.*, 2003). Taken together, these experiments strongly suggest that the release of cytokines constitutes a link between the TMJ injuries and the release of primary hypernociceptive mediators. This concept allows us to understand why the inhibition of cytokines causes analgesia (Ferreira *et al.*, 1997).

AEL was also able to reduce TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  levels in the trigeminal ganglion, suggesting an antinociceptive and anti-inflammatory activity level involving the peripheral nervous system. It is already known that the perception of pain in the orofacial region involves peripheral and central mechanisms (Sessle, 2011). The trigeminal ganglion impulses transmitted by directly entering the brainstem at the bridge region making synapse with second-order neurons in the trigeminal nucleus (Sessle, 2002; Davies *et al.*, 2010). In this process, nociceptors are sensitized by chemicals seen as pro-inflammatory, such as prostaglandins (PGE<sub>2</sub>), serotonin, substance P, tumor necrosis factor (TNF), interleukins and others (Sessle, 1996). In particular, this result is important because the TMJ pain is the result of inflammatory episodes involving inflammatory mediators such as PGE<sub>2</sub>, 5-HT, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and sympathomimetic amines (Kopp, 2001; Venal *et al.*, 2008). Worth noting that TNF- $\alpha$

and IL-1 $\beta$  are considered the principal cytokines in the cascade development of inflammatory hyperalgesia (Verri *et al.*, 2006).

Further, to elucidate possible mechanisms of action of AEL, it was used ZnPP-IX, an specific inhibitor of HO-1. After the pretreatment with ZnPP-IX, the anti-nociceptive and anti-inflammatory efficacy of AEL in zymosan-induced TMJ inflammatory hypernociception in rats was not observed, suggesting that HO-1 activity is involved in the inhibitory effects AEL (Alcaraz *et al.*, 2003; Vicente *et al.*, 2003; Bednarz *et al.*, 2007). In this regard, we have recently demonstrated that ZnPP-IX treatment potentiated the effect of acetic acid by increasing the number of writhes (Grangeiro *et al.*, 2011). Some of our recent studies have demonstrated the involvement of HO-1 pathway in anti-inflammatory and antinociceptive effects of natural products in the TMJ inflammatory hypernociception (Val *et al.*, 2014; Rivanor *et al.*, 2014).

In fact, the immunohistochemical analyses showed an increase in HO-1 expression, synovial cells and connective tissue cells of the AEL treated groups of zymosan-induced TMJ inflammatory hypernociception. HO-1 is induced by oxidative or nitrosative stress, cytokines and other mediators produced during inflammatory processes, likely as part of a defense system in cells exposed to stress to provide a negative feedback for cell activation and the production of mediators, which could modulate the inflammatory response (Alcaraz *et al.*, 2003).

Heme oxygenase (HO) is the rate-limiting enzyme that catalyzes the degradation of heme to liberate carbon monoxide (CO), biliverdin (BVD) and free iron in mammalian cells (Alcaraz *et al.*, 2003). Over the last few years, numerous studies have demonstrated that HO-1 expression and the concomitant production of its metabolites, CO and BVD, have anti-inflammatory consequences (Vane and Warner, 2000; Soares *et al.*, 2004; Majewska *et al.*, 2008). Considering this, we demonstrated that the HO/BVD/CO pathway plays antinociceptive effects during acetic acid-evoked nociception (Grangeiro *et al.*, 2011).

In fact, heme-induced HO-1 was reported to result in a reduction of cell migration, exudation and pro-inflammatory mediators release in a zymosan-induced air pouch inflammation model (Vicente *et al.*, 2003). There is evidence that CO stimulates soluble guanylate cyclase (sGC) activity and increases the cellular levels of cyclic GMP (Dearden *et al.*, 1989; Morita *et al.*, 1995). Ferreira *et al.* (1991) have provided experimental support to suggest that elevated levels of cyclic GMP are



associated with inhibition of nociceptor hypersensitivity. In this regard, our research group demonstrated increased antinociceptive response produced by the combination of agents that increase intracellular cyclic GMP concentrations (Bezerra *et al.*, 2008).

To elucidate other possible mechanism of action of AEL, it was held co-administration of aminoguanidine (a specific inhibitor of inducible NO synthase). Pretreatment of animals with aminoguanidine followed by the administration of AEL, did not reduce their effectiveness. The analgesic and anti-inflammatory effects of AEL (1 mg/kg, i.v.) were observed in the presence of aminoguanidine, suggesting that the NO pathway is not required for AEL efficacy. Moreover, our group demonstrated in the model of zymosan-induced TMJ inflammatory hypernociception in rats that NO reduces hyperalgesia and exerts anti-inflammatory action (Chaves *et al.*, 2011).

While the role of NO in the inflammatory pain appears to an expected finding, the involvement of this molecule still needs further elucidation, probably due to the fact that NO behave as a pro or anti-inflammatory agent, as a dual effect, depending upon the route of administration donor and/or inhibitors of their synthesis, plus the type of inflammatory stimulus used (Cury *et al.*, 2011).

## 5. Conclusions

In conclusion, we demonstrated the anti-nociceptive and anti-inflammatory efficacy of AEL in the model of zymosan-induced TMJ inflammatory hypernociception in rats. Additional, our results strongly suggest that *Abelmoschus esculentus* lectin efficacy, at least in part, depends on the integrity of the HO-1 pathway and that AEL efficacy involves TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  inhibition. Taking into account the well demonstrated anti-nociceptive and anti-inflammatory efficacy of AEL, the designing of alternative compounds to classical anti-inflammatory and analgesic agents is very encouraged to define new pharmacological targets for the inflammatory TMJ painful condition treatment.

**Acknowledgments:** The authors thank Adalberto Nascimento de Lima Júnior and Jordânia Marques de Oliveira for the technical assistance.

## References

- Alcaraz, MJ, Fernández, P, Guillén, MI (2003) Anti-inflammatory actions of the hemeoxygenase-1 pathway. *Curr Pharm Des* 9:2541–2551.
- Araújo, LCC, Aguiar, JS, Napoleão, TH, Mota, FVB, Barros, ALS, Moura, MC, Coriolano, MC, Coelho, LCBB, Silva, TG, Paiva, PMG (2013) Evaluation of Cytotoxic and Anti-Inflammatory Activities of Extracts and Lectins from *Moringa oleifera* Seeds. *Plos One* 8: e81973.
- Bednarz, N, Zawacka-Pankau, J, Kowalska, A (2007) Protoporphyrin IX induces apoptosis in HeLa cells prior to photo-dynamic treatment. *Pharmacol Rep* 59:474–479.
- Bezerra, MM, Brain, SD, Greenacre, S, Jerônimo, SMB, Melo, LB, Keeble, J, Rocha, FAC (2004) Reactive nitrogen species scavenging, rather than nitric oxide inhibition, protects from articular cartilage damage in rat zymosan-induced arthritis. *Br J Pharmacol* 141:172–182.
- Bezerra, MM, Brain, SD, Girão, VCC, Greenacre, S, Keeble, J, Rocha, FAC (2007) Neutrophils-derived peroxynitrite contributes to acute hyperalgesia and cell influx in zymosan arthritis. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 374:265–273.
- Bezerra, MM, Lima, V, Girão, VCC, Teixeira, RC, Graça, JRV (2008) Antinociceptive activity of sildenafil and adrenergic agents in the writhing test in mice *Pharmacol Rep* 60:339–344.
- Botros, FT, Schwartzman, ML, Stier, CT, Goodman, AI, Abraham, NG (2005) Increase in heme oxygenase-1 levels ameliorates renovascular hypertension. *Kidney Int* 68:2745–2755.
- Bradley, PP, Christensen, RD, Rothstein, G (1982) Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. *Blood* 60:618–622.
- Bressan, E, Tonussi, CR (2008) Antiinflammatory effects of etoricoxib alone and combined with NSAIDs in LPS-induced reactive arthritis. *Inflamm Res* 57:586–592.
- Cairns, BE (2010) Pathophysiology of TMD pain—basic mechanisms and their implications for pharmacotherapy. *J Oral Rehabil* 37:391–410.

Cao-Xin, C., Jie-Yu, C., Yin-Li, X., Shu-Zhi, W., Qi, Z., Lu, Y., Zheng-Hong, Q. (2015). Suppression of Inflammation and Arthritis by Orally Administrated Cardiotoxin from *Naja naja atra*, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol.2015, pp.12.

Calixto, JB Campos, MM, Otuki, M F, Santos, ARS (2004) Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. Modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. *Planta Medica* 70:93-103.

Cunha, FQ, Freitas, A, Alves-Filho, JC, Secco, DD, Neto, AF, Ferreira, SH, Barja-Fidalgo, C (2006) Heme oxygenase/carbon monoxide-biliverdin pathway down regulates neutrophil rolling, adhesion and migration in acute inflammation. *British Journal of Pharmacology* 149:345–354.

Cury, Y, Picolo, G, Gutierrez, VP, Ferreira, SH (2011) Pain and analgesia: the dual effect of nitric oxide in the nociceptive system. *Nitric Oxide* 25:243-257.

Cairns, BE (2010) Pathophysiology of TMD pain – basic mechanisms and their implications for pharmacotherapy. *Journal of Oral Rehabilitation* 37:391–410.

Chaves, HV, Ribeiro, RA, de Souza, AM, Silva, AAR, Gomes, AS, Vale, ML, Bezerra, MM, Brito, GA (2011) Experimental model of zymosan-induced arthritis in the rat temporomandibular joint: role of nitric oxide and neutrophils. *J Biomed Biotechnol* 2011:2001-2011.

Choi, HC, Kim, HS, Lee, KY, Chang, KC, Kang, YJ (2008) NS-398, a selective COX-2 inhibitor, inhibits proliferation of IL-1 $\beta$ -stimulated vascular smooth muscle cells by induction of HO-1. *Biochem Biophys Res Commun* 376:753–757.

Davis Charles, G (2012) Mechanisms of chronic pain from whiplash injury. *Journal of Forensic and Legal Medicine* 20: 74-85.

Dearden, DV, Hayashibara, K, Beauchamp, JL, Kirchner, NJ, Van Koppen, PAM, Bowera, MT (1989) Fundamental studies of the energetics and dynamics of ligand

dissociation and exchange processes at transition-metal centers in the gas phase:  $\text{Mn}(\text{CO})_x^+$ ,  $x = 1-6$ . *J Am Chem Soc* 111:2401–2409.

Denadai-Souza, A, Camargo, LL, Ribela, MT, Keeble, JE, Costa, SK., Muscará, MN (2009). Participation of peripheral tachykinin NK receptors in the carrageenan - induced inflammation of the rat temporomandibular joint. *Eur J Pain* 13:812–819.

Devesa, I, Ferrandiz, MA, Terencio, MC, Joosten, LAB, Berg, WBVD, Alcaraz, MJ (2005). Influence of Heme Oxygenase 1 Modulation on the Progression of Murine Collagen-Induced Arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 10: 3230–3238

Davies, AJ, Kim, YH, Oh, SB (2010) Painful Neuron-Microglia Interactions in the Trigeminal Sensory System. *The Open Pain J* 3:14-28.

Ferreira, SH, Duarte, IDG, Lorenzetti, BB (1997) The molecular mechanism of action of peripheral morphine analgesia: Stimulation of the cGMP system via nitric oxide release. *Eur J Pharmacol* 201:121–122.

Gunson, MJ, Arnett, GW, Milam, SB (2012) Pathophysiology and Pharmacologic Control of Osseous Mandibular Condylar Resorption. *J Oral Maxillofac Surg* 70:1918-1934.

Gadó, K, Gigler, G (1991) Zymosan inflammation: a new method suitable for evaluating new antiinflammatory drugs. *Agents Actions* 32:119–121.

Gegout, P, Gillet, P, Chevrier, D, Guingamp, C, Terlain, B, Netter, P (1994) Characterization of zymosan-induced arthritis in the rat: effects on joint inflammation and cartilage metabolism. *Life Sciences* 55:321–326.

Gondim DV, Costa JL, Rocha SS, Brito GAC, Ribeiro RA, Vale ML (2012) Antinociceptive and anti-inflammatory effects of electroacupuncture on experimental arthritis of the rat temporomandibular joint. *Can J Physiol Pharmacol* 90:395–405.

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

Hamada, Y, Kondoh, T, Holmlund, A, Sakota, K S, Nomura, Y, Seto, K (2008) Cytokine and Clinical Predictors for Treatment Outcome of Visually Guided Temporomandibular Joint Irrigation in Patients with Chronic Closed Lock. *J Oral Maxillofac Surg* 66:29-34.

Keystone, EC, Schorlemmer, HU, Pope, C, Allison, AC (1977) Zymosan-induced arthritis: a model of chronic proliferative arthritis following activation of the alternative pathway of complement. *Arthritis Rheum* 20:1396–1401.

Kopp, S, (2001) Neuroendocrine immune, and local responses related to temporomandibular disorders. *J Orofac Pain*15: 9–28.

Kumar, R, Patil, M B, Patil, S R, Paschapur, M S (2009) Evaluation of *Abelmoschus Esculentus* Mucilage as Suspending Agent in Paracetamol Suspension. *Journal of Pharm Tech Research* 1:658-665.

Leite, JFM, Assreuy, AMS, Mota, MRL, Bringel, PHSF, Lacerda, RR, Gomes, VM, Cajazeiras, JB, Nascimento, KS, Pessôa, HLF, Gadelha, CAA, Delatorre, P, Cavada, BS, Santi-Gadelha, T (2012) Antinociceptive and Anti-inflammatory Effects of a Lectin-Like Substance from *Clitoria fairchildiana* R. Howard Seeds. *Molecules* 17:3277-3290.

Maganha EG, Halmenschlager, RDC, Rosa, RM, Henriques JAP, Ramos, ALLDP, Saffi, J. (2010) Pharmacological evidences for the extracts and secondary metabolites from plants of the genus *Hibiscus*. *Food Chemistry* 118:1-10.

Majewska, M, Zajc, K, Dulak, J, Szczepanik, M (2008) Heme oxygenase (HO-1) is involved in the negative regulation of contact sensitivity reaction. *Pharmacol Rep* 60:933–940.

Messing, J, Thöle, C, Niehues, M, Shevtsova, A, Glocker, E, Borén, T, Hensel, A (2014) Antiadhesive Properties of *Abelmoschus esculentus* (Okra) Immature Fruit Extract against *Helicobacter pylori* Adhesion. *Plos one* 9 : e84836.

Monte, LG, Gadelha, TS, Reis, LB, Braganhol, E, Prietsch, RF, Dellagostin, OA, Lacerda, RR, Gadelha, CAA, Conceição, FR, Pinto, LS (2013) Lectin of *Abelmoschus esculentus* (okra) promotes selective antitumor in human breast cancer cell. *Biotechnol Lett* 31:674-680.

Morita, T, Perrella, MA, Lee, ME, Kourembanas, S (1995) Smooth muscle cell-derived carbon monoxide is a regulator of vascular cGMP. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:1475–1479.

Napimoga, MH, Cavada, BS, Alencar, NMN, Mota, ML, Bittencourt, FS, Alves-Filho, JC, Grespan, R, Gonçalves, RB, Clemente-Napimoga, JT, Freitas, A, Parada, CA, Ferreira, SH, Cunha, FQ (2007) *Lonchocarpus sericeus* lectin decreases leukocyte migration and mechanical hypernociception by inhibiting cytokine and chemokines production. *International Immunopharmacology* 7:824–835.

Nordahl, S, Alstergren, P, Kopp, S (2000) 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* 58:525–30.

Nunes, BS, Renzonnet, NS, Dal-Secco, D, Vieira, SM, Cavada, BS, Teixeira, EH, Moura, TR, Teixeira, CS, Clemente-Napimoga, JT, Cunha, FQ, Napimoga, MH (2009) Lectin extracted from *Canavalia grandiflora* seeds presents potential anti-inflammatory and analgesic effects. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol* 10:370-374.

Oakley, M, Vieira, AR (2008) The many faces of the genetics contribution to temporomandibular joint disorder. *Orthod Craniofac Res* 11:125–135.

Piya, P., Puritat, K., Arunporn, I. (2015). The Clinical Efficacy and Safety of the Sahastara Remedy versus Diclofenac in the Treatment of Osteoarthritis of the Knee: A Double-Blind, Randomized, and Controlled Trial, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol.2015, pp.8.

Ritter, A.M.V., Ames, F.Q., Otani, F., Oliveira, R.M.W., Cuman, R.K.N., Bersani-Amado, C.A. (2014). Effects of Anethole in Nociception Experimental Models, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2014, pp. 1.

Rivanor, RLC, Chaves, HV, Val, D R, Freitas, AR, Lemos, JC, Rodrigues, JAG, Pereira, KMA, Araújo, IWF, Bezerra, MM, Benevides, NMBA (2014) lectin from the green seaweed *Caulerpa cupressoides* reduces mechanical hyper-nociception and inflammation in the rat temporomandibular joint during zymosan-induced arthritis. *International Immunopharmacology* 21:34–43.

Rocha, FAC, Aragao Jr, AGM, Oliveira, RC, Pompeu, MML, Vale, MR, Ribeiro, RA (1999) Periarthritis promotes gait disturbance in zymosan-induced arthritis in rats. *Inflamm Res* 48:485–490.

Sabitha, V, Ramachandran, S, Naveen, KR, Panneerselvam, K (2011) Antidiabetic and antihyperlipidemic potential of *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench. In streptozotocin-induced diabetic rats. *J Pharm Bioallied Sci.* 3: 397-402.

Sessle, BJ (2011) Peripheral and central mechanisms of orofacial inflammatory pain. *Int Rev Neurobiol.* 97:179-20

Sessle, BJ (2002) Recent Insights into Brainstem Mechanisms Underlying Craniofacial Pain. *J. of Dent* 66:108-112.

Sessle, BJ (1996) Mechanism of trigeminal and occipital pain. *Pain Rev* 3:91-116.

Silva, LMCS, Lima, V, Holanda, ML, Pinheiro, PG, Rodrigues, JAG, Lima, MEP, Benevides, NMB (2010) Antinociceptive and Anti-inflammatory Activities of Lectin from Marine Red Alga *Pterocladia capillacea*. *Biol. Pharm. Bul.* 33:830-835.

Soares GSF, Assreuy AMS, Gadelha CAA, Gomes VM, Dela-Torre, P, Simoes, RS, Cavada, BS, Leite, JF, Nagano, CS, Pinto, NV, Pessoa, HLF, Santi-Gadelha, T (2012) Purification and biological activities of *Abelmoschus esculentus* seed lectin. *Protein J* 31:674–680.

Soares, MP, Seldon, MP, Gregoire, IP, Vassilevskaia, T, Berberat, PO, Yu, J, Tsui, TY, Bach, FH (2004) Heme oxygenase-1 modulates the expression of adhesion molecules associated with endothelial cell activation. *J Immunol* 172:3553–3563.

Suzuki T, Segami N, Nishimura M, Nojima T (2002) Co-expression of interleukin-1 $\beta$  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* 31:549–57.

Smith, WL, Meade, EA, Dewitt, D (1994) Interactions of pgh synthase isozymes-1 and -2 with nsaid. *Anny acad sci.* 744:50-7.

Val, DR, Bezerra, MM, Silva, AAR, Pereira, KMA, Rios, LC, Lemos JC, Arriaga, NC, Vasconcelos, JN, Benevides, NMB, Pinto, VPT, Cistino-Filho, G, Brito, GAC, Silva, FRL, Santiago, GMP, Arriaga, AMC, Chaves, HV (2014) *Tephrosia toxicaria* Pers. reduces temporomandibular joint inflammatory hypernociception: The involvement of the HO-1 pathway. *Eur J Pain* 18:1280-1289

Vane, JR, Warner, TD (2000) Nomenclature for COX-2 inhibitors. *Lancet* 356:1373–1374.

Vernal R, Velásquez, E, Gamonal, J, Garcia-Sanz, JA, Silva, A, Sanz, M (2008) Expression of proinflammatory cytokines in osteoarthritis of the temporomandibular joint. *Arch Oral Biol* 53:910–915.

Verri WA Jr, Cunha TM, Parada CA, Poole S, Cunha FQ, Ferreira SH (2006) Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development? *Pharmacol Ther* 112: 116-138.

Vicente, AM, Guillen, MI, Habib, A, Alcaraz, MJ (2003) Beneficial effects of heme oxygenase-1 up-regulation in the development of experimental inflammation induced by zymosan. *J Pharmacol Exp Ther* 307:1030–1037.



## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A lectina de *Abelmoschus esculentus* (AEL) apresentou efeito antinociceptivo no modelo de hipernocicepção inflamatória induzida por Zy na ATM de ratos, reduzindo a hipernocicepção mecânica;
- AEL apresentou efeito anti-inflamatório no modelo de hipernocicepção inflamatória induzida por Zy na ATM de ratos, reduzindo o infiltrado celular inflamatório na membrana sinovial da ATM e a atividade da MPO no lavado sinovial;
- O efeito anti-inflamatório desempenhado por AEL nesse modelo parece estar relacionado com a redução da produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ;
- Além disso, a eficácia de AEL demonstrou ser dependente da integridade da via da hemeoxigenase (HO-1);
- A via do óxido nítrico (NO) não participa do efeito antinociceptivo e anti-inflamatório mediado por AEL.

## 7. CONCLUSÃO

A lectina de *Abelmoschus esculentus* (AEL) apresentou efeitos antinociceptivos e anti-inflamatórios no modelo de hipernocicepção inflamatória induzida por Zy na ATM de ratos. O mecanismo de ação de AEL envolve redução dos níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  e a integridade da via HO-1.

## 8. 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.
- AJUEBOR, M. N.; VIGÁG, L.; FLOWER, R. J.; PERRETTI, M.; SZABO, C. Role of inducible nitric oxide synthase in the regulation of neutrophil migration in zymosan induced inflammation. **Immunol.** v.95, p. 625-630, 1998.
- ALCARAZ, M.J.; FERNANDEZ, P.; GUILLEN, M.I. Anti-inflammatory actions of the heme oxygenase-1 pathway. **Curr Pharm Desig** (9): 2541–2551, 2003.
- ALENCAR, N. M., ASSREUY, A. M., HAVT, A., BENEVIDES, R. G., DE MOURA, T. R., DE SOUSA, R. B., CAVADA, B. S. Vatairea macrocarpa (Leguminosae) lectin activates cultured macrophages to release chemotactic mediators. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**; 374(4), 275-282, 2007.
- ALMEIDA, T.F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Res.**, v.1000, p.40-56, 2004.
- ALSTERGREN P. Cytokines in temporomandibular joint arthritis. **Oral Dis.**, v. 6, p. 331-334, 2000.
- ALSTERGREN, P.; BENAVENTE, C.; KOOP, S. Interleukin 1 $\beta$ , Interleukin 1 receptor antagonist, and Interleukin 1 soluble receptor II in temporomandibular joint synovial fluid from patients with chronic polyarthritides. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 61, n. 10, p. 1171-1178, 2003.
- ALSTERGREN, P.; ERNBERG, M.; KVARNSTRÖM, M.; KOOP, S. Interleukin 1 $\beta$  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 $\beta$  and serotonin. **Acta Odontol. Scand.**, v. 57, n. 1, p. 16-22, 1999.
- AMERICAN ASSOCIATION FOR DENTAL RESEARCH. Temporomandibular disorders. Acesso em 24 de junho de 2012.
- ASSREUY, A. M. S., FONTENELE, S. R., DE FREITAS PIRES, A., FERNANDES, D. C., RODRIGUES, N. V. F. C., BEZERRA, E. H. S., CAVADA, B. S. Vasodilator effects of Diocleinae lectins from the Canavalia genus. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**; 380(6), 509-521, 2009.
- 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.

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.

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

CAIRNS, B. E., Pathophysiology of TMD pain—basic mechanisms and their implications for pharmacotherapy. **Journal of oral rehabilitation**; 37(6), 391-410, 2010.

CANNON, G. W.; OPENSHAW, S. J.; HIBBS, J. B.; HOIDAL, J. R.; HUECKSTEADT, T. P.; GRIFFITHS, M. M. Nitric oxide production during adjuvant-induced and collagen-induced arthritis. **Arthritis Rheum**; 39(10):1677-1684, 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.

CASTRO, M. M.; GODOY, A. R.; CARDOSO, A. I. I. Qualidade de sementes de quiabeiro em função da idade e do repouso pós-colheita dos frutos. *Ciência e agrotecnologia*, Lavras, v. 32, n. 5, p. 1491-1495, 2008.

CAVICCHI, M.; GIBBS, L.; WHITTLE, B. J. Inhibition of inducible nitric oxide synthase in the human intestinal epithelial cell line, DLD-1, by the inducers of heme oxygenase 1, bismuth salts, heme, and nitric oxide donors. **Gut**; 47: 771-8, 2000.

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.; 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.

CHAVES, HV. **Modelo de artrite na articulação temporomandibular induzida por zymosan em ratos e estudo da via da hemeoxigenase-1/biliverdina/monóxido de carbono.** Tese de Doutorado. 2012.

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

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.

CHOI, B. M.; PAE, H. O.; CHUNG, H. T.; Nitric oxide priming protects nitric oxide-mediated apoptosis via heme oxygenase-1 induction. **Free Radic Biol Med** 2003; 34: 1136-45.

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 $\beta$  in osteoarthritic osteoblasts. **Biochem Pharmacol.**, v. 83, n. 3, p. 395-405, 2012a.

CLÉRIGUES, V.; GUILLÉN, M.I.; GOMAR, F.; ALCARAZ, M.J. Heme oxygenase-1 counteracts the effects of interleukin-1 $\beta$  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.

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

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.

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

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. **Arthrit Rheumat**, v. 52, n. 10, p. 3230–3238, 2005b.

DO VAL, D.R., BEZERRA, M.M., SILVA, A.A.R., PEREIRA, K.M.A., RIOS, L.C., LEMOS, J.C., ARRIAGA, N.C., VASCONCELOS, J.N., BENEVIDES, N.M.B., PINTO, V.T.P., CRISTINO-FILHO, G., BRITO, G.A.C., SILVA, F.R.L., SANTIAGO, G.M.P., ARRIAGA, A.M.C., CHAVES, H.V. Tephrosia toxicaria Pers. Reduces

temporomandibular joint inflammatory hypernociception: the involvement of the HO-1 pathway. **Eur. J. Pain.**; v.18, 1280–1289, 2014.

EMSHOFF, R.; PUFFER, P.; RUDISCH, A.; GABNER, R. Temporomandibular joint pain: relationship to internal derangement type, osteoarthritis, and synovial fluid mediator level of tumor necrosis factor- $\alpha$ . **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 90, p. 442-449, 2000.

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

Fernandes, W.V.B., Michelotto, A.B., Kimura, S.,. Comparação entre Técnicas Osteopáticas e Fisioterapia Convencional para o Tratamento das Desordens Temporomandibulares. **Revista Inspirar**;1 (1): 29-33, 2009.

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.

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.**; 149(4): 345-354, 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.

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

GONÇALVES 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.

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.

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.

GUO, X.; SHIN, V. Y.; CHO, C. H. Modulation of heme oxygenase in tissue injury and its implication in protection against gastrointestinal diseases. **Life Sci** 2001; 69: 3113-9.

HELMY, E.; BAYS, R.; SHARAWY, M. Osteoarthrosis of the temporomandibular joint following experimental disc perforation in *Macaca fascicularis*. **J Oral Maxillofac Surg**; 46: 979-90, 1988.

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.

<http://www.aadronline.org/i4a/pages/index.cfm?pageid=3465followedby>.

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 for internal derangement and osteoarthritis of the temporomandibular joint with experimental traction of the mandibular ramus in rabbit. **Oral Dis**;7:85-91, 2001.

ISHIMARU, J.; HANDA, Y.; KURITA, K.; GOSS, A. N. The effect of occlusal loss on normal and pathological temporomandibular joints: an animal study. **J Oral Maxillofac Surg**; 22:95-102, 1994.

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.; 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 .

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- $\kappa$ B in TNF- $\alpha$ -induced COX-2 Expression in Synovial Fibroblasts from Human TMJ. **J Dent Res.**, v. 86, n.4. p.363-367, 2007.

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

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.

KNOWLES, R. G.; PALACIOS, M.; PALMER, R. M.; MONCADA S. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A** 1989; 86(13):5159-5162.

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.

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

KUMAR, R., PATIL, M.B., PATIL, S.R., & PASCHAPUR, M.S. Evaluation of *Abelmoschus esculentus* mucilage as suspending agent in paracetamol suspension. **Int J. Pharm.Tech. Res.**,1(3): 658-665, 2009.

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  $\mu$ -Opioid Receptor Into the Temporomandibular Joint. **Arthrit Rheum**, v. 56, n. 6, p. 2038–2048, 2007.

LAM, D. K.; SESSLE, B. J.; , 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.



LAMAS, S.; MARSDEN, P. A.; LI, G. K.; TEMPST, P.; MICHEL, T. Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. **Proc. Natl. Acad. Sci**; 89(14): 6348-6352, 1992.

LEKKAS, C. Experimental degenerative temporomandibular joint disease. **Int J Oral Maxillofac Surg**; 23:423-4, 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.

LIS, H.; SHARON, N. Biological properties of lectins. **The lectins: properties, functions and application in biology and medicine**, p. 265-291, 1986.

LIS, H.; SHARON, N. Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition, **Chemical Rev.** v. 98, p. 637-674, 1998.

LOESER, J.D.; TREEDE, R.D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain.** v. 137, p. 473–477, 2008.

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

MANISKOSA, R., NIKOLIĆ, A.J., & NEDIĆ, O. Lectin-induced alterations of the interaction of insulin and insulin-like growth factor 1 receptors with their ligands. **Journal of the Serbian Chemical Society**, 73(8-9), 793-804, 2008.

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.

MCCARTNEY-FRANCIS, N.; ALLEN, J. B.; MIZEL, D. E. Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. **J Exp Med**; 178:749-754,1993.

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.

MCINNES, I. B.; LEUNG, B. P.; FIELD, M.; WEI, X. Q.; HUANG, F. P.; STURROCK, R. D.; KINNINMONTH, A.; WEIDNER, J.; MUMFORD, R.; LIEW, F. Y. Production of nitric oxide in the synovial membrane of rheumatoid and osteoarthritis patients. **J Exp Med**; 184(4):1519-1524,1996.

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.

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

MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, J. R.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol Rev**;43(2): 109-142,1991.

MOTTERLINI, R.; GREEN, C. J.; FORESTI, R. Regulation of heme oxygenase-1 by redox signals involving nitric oxide. **Antioxid Redox Signal** 2002; 4: 615-24.

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.

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.

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.

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.; 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.

OKESON, J. P.; Tratamento das desordens temporomandibulares e oclusão. Rio de Janeiro: **Elsevier** 2008.

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.; FEARNNS, 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.

PANERO, F. S., M; VIEIRA F. P.; CRUZ Â. M. F, M. F. V. MOURA; SILVA, H. E. B.. Aplicação da análise exploratória de dados na discriminação geográfica do quiabo do Rio Grande do Norte e Pernambuco. **Eclética Química**, São Paulo, 34(3): 33 - 40, 2009.

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. **Artrit 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-alpha-induced apoptosis in cultured fibroblasts. **Am J Physiol**, v. 278, p. 312–319, 2000.

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

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

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.**; doi: 10.1002/j.1532-2149.2012.00114.x., 2012.

RANGEL, T. B. A., ASSREUY, A. M. S., PIRES, A. D. F., CARVALHO, A. U. D., BENEVIDES, R. G., SIMÕES, R. D. C., NAGANO, C. S. Crystallization and characterization of an inflammatory lectin purified from the seeds of *Dioclea wilsonii*. **Molecules**; 16(6): 5087-5103, 2011.

RIDGER, V. C.; PETTIPHER, E. R.; BRYANT, C. E.; BRAIN, S. D. Effect of the inducible nitric oxide synthase inhibitors aminoguanidine and L-N6-(1-iminoethyl) lysine on zymosan-induced plasma extravasation in rat skin. **J. Immunol.** v. 159, p. 383-390, 1997.

RIVANOR, R.L.C., CHAVES, H.V., DO VAL., D.R., FREITAS, A.R., LEMOS, J.C., RODRIGUES, J.A.G., PEREIRA, K.M.A., ARAÚJO, I.W.F., BEZERRA, M.M., BENEVIDES, N.M.B.A. A Lectin from the green seaweed *Caulerpa cupressoides* reduces mechanical hypernociception and inflammation in the rat temporomandibular joint during zymosan-induced arthritis, **Int. Immunopharmacol**; 21: 34-43, 2014.

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

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

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

RODRIGUES, J.A.G., CHAVES, H.V., ALVES, K.S., FILGUEIRA, A.A., BEZERRA, M.M., BENEVIDES, N.M. Structural features and assessment of zymosan-induced arthritis in rat temporomandibular joint model using sulfated polysaccharide. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**; 36 (2): 127-135, 2014.

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

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

SABITHA, S.R., NAVEEN, K.R., PANNEERSELVAM, K. Antidiabetic and anti-hyperlipidemic potential of *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench. In streptozotocin induced diabetic rats. **J. Pharm. Bioallied Sci.**, 3: 397-402, 2011.

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.

SESSA, W. C.; HARRISON, J. K.; BARBER, C. M.; ZENG, D.; DURIEUX, M. E.; D'ANGELO, D. D.; LYNCH, K. R.; PEACH, M. J. Molecular cloning and expression of a cDNA encoding endothelial cell nitric oxide synthase. **J Biol Chem** 1992; 267(22): 15274-15276.

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

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.

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

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

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

STADLER, J.; STEFANOVIC-RACIC, M.; BILLIAR, T. R.; CURRAN, R. D.; MCINTYRE, L. A.; GEORGESCU, H. I.; SIMMONS, R. L.; EVANS, C. H. Articular chondrocytes synthesize nitric oxide in response to cytokines and lipopolysaccharide. **J Immunol**; 147(11): 3915-3920, 1991.

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** 2001; v. 132, p. 1673 – 1682.

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

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.

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

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 $\beta$ , 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.

TONUSSI, C. A.; FERREIRA, S. H. Rat knee-joint carrageenin incapacitation test: An objective screen for central and peripheral analgesics. **Pain** 1992; 48: 421–7

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.

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

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.

VASCONCELOS, S.M.M., LIMA, S. R., SOARES, P. M., ASSREUY, A.M.S., DE SOUSA, F. C. F., LOBATO, R. D. F. G. & PATROCÍNIO, M.C.A. Central action of *Araucaria angustifolia* seed lectin in mice. **Epilepsy & Behavior**;15(3), 291-293, 2009.

VERMEIRE, K.; THIELEMANS, L.; MATTHYS, P.; BILLIAU, A. The effects of NO synthase inhibitors on murine collagen-induced arthritis do not support a role of NO in the protective effect of IFN-gamma. **J Leukoc Biol** 2000; 68(1):119-124.

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.

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.

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

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.

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.

WERNER-FELMAYER, G.; WERNER, E. R.; FUCHS, D.; HAUSEN, A.; REIBNEGGER, G.; WACHTER, H. Tetrahydrobiopterin-dependent formation of nitrite and nitrate in murine fibroblasts. **J Exp Med**; 172(6):1599-1607,1990.

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

WRIGHT, C. D.; MULSCH, A.; BUSSE, R.; OSSWALD, H. Generation of nitric oxide by human neutrophils. **Biochem. Biophys. Res Commun**; 160(2):813-819, 1989.

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.

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.