



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

CAMPUS DE SOBRAL

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

SAMILLA PONTES BRAGA

**CASEÍNA E SEUS HIDROLISADOS DE PEPSINA E TRIPSINA DO LEITE DE
CABRA REDUZEM A HIPERNOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA DA
ARTICULAÇÃO TEMPOROMANDIBULAR EM RATOS: PAPEL POTENCIAL
PARA TNF- α , IL-1 β E IL-10**

SOBRAL-CE

2020

SAMILLA PONTES BRAGA

**CASEÍNA E SEUS HIDROLISADOS DE PEPSINA E TRIPSINA DO LEITE DE
CABRA REDUZEM A HIPERNOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA DA
ARTICULAÇÃO TEMPOROMANDIBULAR EM RATOS: PAPEL POTENCIAL
PARA TNF- α , IL-1 β E IL-10**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará-Campus Sobral como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde. Área de concentração: Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dra. Hellíada Vasconcelos Chaves

SOBRAL – CE

2020

SAMILLA PONTES BRAGA

**CASEÍNA E SEUS HIDROLISADOS DE PEPSINA E TRIPSINA DO LEITE DE
CABRA REDUZEM A HIPERNOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA DA
ARTICULAÇÃO TEMPOROMANDIBULAR EM RATOS: PAPEL POTENCIAL
PARA TNF- α , IL-1 β E IL-10**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará-Campus Sobral como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde. Área de concentração: Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dra. Hellíada Vasconcelos Chaves

Aprovado em: ___/___/_____

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Hellíada Vasconcelos Chaves (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC) – *Campus Sobral*

Prof^a. Dra. Conceição da Silva Martins (Examinadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC) – *Campus Fortaleza*

Prof^a. Dra. Mirna Marques Bezerra Brayner (Examinadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC) – *Campus Sobral*

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)

B795c Braga, Samilla Pontes.
CASEÍNA E SEUS HIDROLISADOS DE PEPSINA E TRIPSINA DO LEITE DE
CABRA REDUZEM A HIPERNOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA DA ARTICULAÇÃO
TEMPOROMANDIBULAR EM RATOS: PAPEL POTENCIAL PARA TNF- α ; IL-1 β ;
E IL-10 / Samilla Pontes Braga. – 2019.
67 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Campus de Sobral,
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Sobral, 2020.
Orientação: Prof. Dr. Hellíada Vasconcelos Chaves.

1. Leite caprino. 2. Articulação temporomandibular. 3. TNF α ; 4. IL-1 β ; 5.
IL-10. . I. Título.

CDD 610

À Deus, por guiar meus passos.
Aos meus pais Raimundo Welton e Ellis
Regina por sempre estarem ao meu lado.
Ao meu irmão Samuel Levy por sempre me apoiar.
À Guilherme Noronha por todo amor e dedicação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a DEUS, por ter me dado a oportunidade de ingressar nesse mestrado e ter me dado, até aqui, força para a concretização dessa etapa.

Aos meus queridos pais, parentes e amigos, agradeço muito pelo incentivo, conselhos, apoio e paciência que foram fundamentais na conclusão deste objetivo.

Ao meu namorado, Guilherme, obrigada por toda compreensão, amor e por sempre me oferecer palavras de apoio e incentivo.

À Paula Perrazo, que forneceu as amostras da caseína e dos hidrolisados e sempre foi disponível e atenciosa.

À prof Mirna por toda paciência e disponibilidade.

A todos que compõem o Laboratório de Farmacologia da UFC – Campus Sobral (LASF).

A nossa técnica do LaSF, Nayara, obrigada pelo apoio e a veterinária do campus, Alana, por toda paciência, simpatia e boa vontade!

Agradeço também ao apoio técnico da Jordana e Anderson Weyne. Vocês são 10.

Agradecimento especial para as colegas de mestrado Maria Ester e Germana e aos ICs Sarah, Ariely, Pedro Fontenele, Pedro W, Sebastião, Luize, Tiago, Manoel e Dina Andressa. Obrigada pela disponibilidade, boa vontade e amizade ao longo de 2019. Sempre lembrarei de todos com muito carinho.

Agradeço também e especialmente a minha orientadora Prof^a Dr^a Hellíada Vasconcelos Chaves, por ser um exemplo de pesquisadora e por todos os ensinamentos até aqui.

Obrigada à Universidade Federal do Ceará (UFC); ao Laboratório de Farmacologia de Sobral (LaFS – UFC); ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde; à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); à Fundação Cearense de Amparo à Pesquisa (FUNCAP) e ao Instituto Nacional de ciência e tecnologia em biomedicina do semi-árido brasileiro (INCT-IBISAB) pelo apoio e custeio deste projeto.

Enfim, a todos que de forma direta ou indireta auxiliaram na concretização deste trabalho. Os meus sinceros agradecimentos!

RESUMO

A dor é uma experiência complexa e multifacetada que pode afetar a região orofacial. A articulação temporomandibular (ATM) é uma das estruturas que podem ser acometidas, resultando em condição clínica de curso incapacitante, as disfunções temporomandibulares (DTM). A farmacoterapia tem sido utilizada no tratamento das DTMs, porém, devido à efetividade limitada e efeitos adversos importantes, faz-se oportuno a busca por novos medicamentos. O leite caprino é uma matriz alimentar de alto valor nutritivo e com propriedades que vêm sendo avaliadas. O objetivo do estudo foi investigar o efeito antinociceptivo e anti-inflamatório da fração caseínica do leite caprino (FCN) e de dois hidrolisados, obtidos a partir da sua hidrólise com pepsina (HDP) e tripsina (HDT), em um modelo de hipernocicepção inflamatória induzida por formalina na ATM de ratos. Para tanto, ratos Wistar machos (180-240 g, n=5) foram pré-tratados (v.o.) com FCN (1 mg/kg), HDP (1 mg/kg) e HDT (1 mg/kg). Após 60 minutos, foi aplicada injeção intra-articular (i.a.) de solução salina (50 µL, 0,9%) no grupo controle ou formalina (50 µL, 1,5%) na ATM esquerda. A resposta nociceptiva foi mensurada pela quantificação, em segundos, do ato do rato coçar a região da ATM esquerda e pelo número de vezes de erguer a cabeça de forma reflexiva por 45 minutos. Em seguida, os animais foram perfundidos com paraformaldeído sob anestesia, seguidos da retirada da ATM e do gânglio trigeminal (GT) para análise imunohistoquímica por TMA para as citocinas TNF α , IL-1 β e IL-10. Além disso, investigaram-se os papéis das vias da hemeoxigenase-1 (HO-1) e do óxido nítrico (NO) no mecanismo de ação antinociceptivo dos hidrolisados. Os resultados mostraram que as três amostras estudadas apresentaram efeitos antinociceptivos através da redução da resposta comportamental nociceptiva. HDP e HDT mostraram efeito antinociceptivo e anti-inflamatório independente das vias da HO-1 e NO, porém foram capazes de reduzir as citocinas TNF α , IL-1 β e aumentar IL-10 na ATM e no GT. Os compostos HDP e HDT apresentam, portanto, atividade antinociceptiva e anti-inflamatória mediadas pelas citocinas TNF α , IL-1 β e IL-10.

Palavras-chave: Leite caprino; Articulação temporomandibular; TNF α ; il-1 β ; IL-10.

ABSTRACT

Pain is a complex and multifaceted experience that can affect the orofacial region. The temporomandibular joint (TMJ) is one of the structures that can be affected, resulting in a clinical condition of the disabling course, such as temporomandibular disorders (TMD). Pharmacotherapy has been used in the treatment of TMDs, however, due to the limited effectiveness and important adverse effects, it makes possible the search for new drugs. Goat milk is a food matrix of high nutritional value and with properties that have been evaluated. The objective of the study was to investigate the antinociceptive and anti-inflammatory effect of the casein fraction of goat milk (CNF) and two hydrolysates, from its hydrolysis with pepsin (HDP) and trypsin (HDT), in a model of hypernociception induced by formalin in the TMJ of rats. For this purpose, male Wistar rats (180-240 g, n = 5) were pre-treated (per os) with CNF (1 mg / kg), HDP (1 mg / kg) and HDT (1 mg / kg). After 60 minutes, an intra-articular injection (a.i.) of saline solution (50 μ L, 0.9%) was applied in the control group or formalin (50 μ L, 1.5%) in the left TMJ. The nociceptive response was measured by quantifying, in seconds, the act of the mouse scratching the left TMJ region and by the number of times to raise the head reflexively over the 45 minutes period. Then, the animals were perfused with general anesthesia, followed by the removal of the TMJ and the trigeminal ganglion (TG) for immunohistochemical analysis by TMA for cytokines TNF α , IL-1 β and IL-10. In addition, we investigated the roles of hemeoxygenase-1 (HO-1) and nitric oxide (NO) pathways in the antinociceptive mechanism of action of hydrolysates. The results showed that the three samples studied showed antinociceptive effects by reducing the nociceptive behavioral response. HDP and HDT have an antinociceptive and anti-inflammatory effect independent of the HO-1 and NO pathways, but can reduce the cytokines TNF α , IL-1 β and increase IL-10 in TMJ and TG. The HDP and HDT compounds, therefore, have antinociceptive and anti-inflammatory activity mediated by the cytokines TNF α , IL-1 β and IL-10.

Key-Words: Goat milk; Temporomandibular joint; TNF- α ; IL-1 β ; IL-10.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1A – Principal via somatossensorial da face e da boca

Figura 1 – Efeito de FCN na hipernocicepção inflamatória induzida por formalina na ATM de ratos

Figura 2 – Efeito de HDP na hipernocicepção inflamatória induzida por formalina na ATM de ratos

Figura 3 – Efeito de HDT na hipernocicepção inflamatória induzida por formalina na ATM de ratos

Figuras 4 A e B – Efeitos do ZnPP-IX na eficácia antinociceptiva dos hidrolisados na hipernocicepção inflamatória induzida por formalina na ATM de ratos.

Figura 5 A e B – Efeitos da aminoguanidina na eficácia antinociceptiva dos hidrolisados na hipernocicepção inflamatória induzida por formalina na ATM de ratos.

Figura 6 – Fotomicrografias de imunohistoquímica para TNF- α

Figura 7– Fotomicrografias de imunohistoquímica para IL-1 β

Figura 8 – Fotomicrografias de imunohistoquímica para IL-10

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATM: Articulação temporomandibular
DTM: Disfunção temporomandibular
IASP: Associação internacional para o estudo da dor
AINEs: Anti-inflamatórios não esteroidais
AADR: Associação americana para a pesquisa dental
AAOP: Academia Americana de Dor Orofacial
SNC: Sistema nervoso central
iNOS: Óxido nítrico sintase induzida
NO: Óxido nítrico
IFN: Interferon
IFN-g: Interferon gama
IL: Interleucina
IL-1: Interleucina 1
IL-1 α : Interleucina 1 α
IL-1 β : Interleucina 1 β
IL-6: Interleucina 6
IL-2: Interleucina 2
IL-8: Interleucina 8
IL-10: Interleucina 10
TNF- α : Fator de necrose tumoral α
CINC-1: Citocinas quimioatraentes 1
HO-1: Hemoxigenase-1
COX-2: Ciclooxygenase tipo 2
CINC-1: Citocina quimioatraente 1
IL-1RA: Antagonista do receptor de IL-1
MMP: Metaloproteinase de matriz
SP: Substância P
CGRP: Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
HO: Hemeoxigenase
HO-1: Hemeoxigenase 1
CO: Monóxido de carbono
BVD: Biliverdin
PGE2: Prostaglandina 2

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1. Dor orofacial	14
2.2. Disfunção temporomandibular (DTM)	16
2.3. Mediadores envolvidos na dor e inflamação da ATM	18
2.3.1. Citocinas	18
2.3.2. Heme-oxigenase	22
2.3.3. Óxido nítrico	23
2.4. Leite caprino	24
3. JUSTIFICATIVA	26
4. OBJETIVOS GERAL E ESPECÍFICOS.....	27
4.1. Objetivo Geral:	27
4.2. Objetivos Específicos:.....	27
5. CAPÍTULO 1: Casein and its pepsin and trypsin hydrolysates of goat milk reduces temporomandibular joint inflammatory hypernociception in rats: Putative role for TNF-α, IL-1β, and IL-10	28
6. REFERÊNCIAS	52
ANEXO A: Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).....	67

1. INTRODUÇÃO

A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) definiu a dor como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano real ou potencial aos tecidos, ou descrita em termos de tais danos. Além disso, a dor é considerada uma experiência multidimensional sensorial-discriminativa que abrange qualidades cognitivas, motivacionais e afetivas. (MERSKEY; BOGDUK, 2012).

A dor orofacial é uma área em crescente estudo. Sabe-se que está relacionada aos tecidos moles e duros da cabeça, face e pescoço, e que apresenta características fisiopatológicas únicas que as distinguem de outros tipos de dor (DE ROSSI, 2013). Dentre as dores orofaciais, destacam-se as DTMs (Disfunções temporomandibulares), que constituem um grupo de condições musculoesqueléticas e neuromusculares que envolvem as articulações temporomandibulares (ATMs), os músculos mastigatórios e todos os tecidos associados (GREENE, 2010). Tendo em vista sua etiologia multifatorial, diagnóstico e tratamento complexos e procura tardia por tratamento, lançar mão de abordagens farmacológicas para o alívio sintomático das dores existentes na DTM torna-se crucial para a obtenção de qualidade de vida dos pacientes, fazendo-se oportuno e necessária a busca por novos medicamentos (OKESON, 2008; CAIRNS, 2010).

Nesse contexto, a exploração de produtos naturais é, muitas vezes, o único recurso terapêutico de variadas comunidades em todo o mundo. A pesquisa de recursos naturais vegetais e animais tem-se revelado promissora na descoberta de ferramentas farmacológicas que podem ser utilizadas para testes de novas substâncias. Essa prática vem despertando a atenção da comunidade científica na perspectiva de avaliar a eficácia e segurança desses novos produtos (MACIEL et al., 2001).

O leite de qualquer espécie de mamífero contém uma mistura complexa de proteínas que variam em concentração, estrutura e solubilidade. Elas são distribuídas em diferentes fases: caseínas (presentes na forma de micelas), proteínas do soro do leite (na forma solúvel) e proteínas da membrana dos glóbulos de gordura (EL-SALAM, 2014).

Peptídeos de lácteos apresentam grandes versatilidades fisiológicas e físico-químicas, características que podem colocá-los como constituintes promissores para incorporação em alimentos funcionais, suplementos dietéticos e formulações farmacêuticas direcionadas a doenças específicas (PATIL et al., 2015). Nesse sentido, a atividade antinociceptiva do leite caprino na dor orofacial ainda não foi explorada, sendo foco do presente trabalho.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Dor orofacial

A dor orofacial está associada aos tecidos moles e duros da cabeça, face e pescoço. A sua origem é bastante variável, podendo advir da polpa dentária, tecidos periodontais, vasos sanguíneos, glândulas, músculos, ossos, seios da face e da articulação temporomandibular (ATM). Destaca-se processos pulpares e periodontais, sinusites, neuropatias, dores musculares e da ATM (MCNEILL *et al*, 1990). As numerosas estruturas anatômicas na cabeça e pescoço, associadas à complexa inervação da região orofacial, leva a uma gama de possibilidades diagnósticas em pacientes com queixa de dor orofacial, necessitando da colaboração interdisciplinar na avaliação e tratamento (DE ROSSI *et al*, 2013).

Estudos no século XX demonstraram que a dor orofacial é frequentemente associada à disfunção psicológica, e pacientes que relataram sintomas de dor orofacial também apresentaram taxas mais altas de ansiedade e depressão (MCCREARY *et al.*, 1991; CURRAN *et al.*, 1996; KORSZUN *et al.*, 1996; CARLSON *et al.*, 1998). Isto parece ocorrer porque as condições que incluem dor crônica resultam em morbidade psicológica e redução da qualidade de vida de um modo geral. (AGGARWAL *et al*, 2010).

As comorbidades mais frequentemente relacionadas aos pacientes portadores de dor orofacial incluem: Depressão, ansiedade, catastrofização da dor e presença de outras dores crônicas (ZAKRZEWSKA, 2013). Assim, a dor orofacial tem se mostrado uma experiência comum que apresenta efeitos sociopsicológicos profundos e impacto na qualidade de vida da população (DE ROSSI *et al*, 2013).

Em particular, o complexo nuclear sensorial do tronco cerebral trigeminal dos mamíferos é uma estrutura bilateral multinucleada no tronco cerebral dorsolateral que se estende da ponte até a medula espinhal cervical superior. Quando se trata da fisiologia da dor orofacial, essa estrutura é o foco de atenção, uma vez que é a principal região do cérebro onde as informações sensoriais craniofaciais são primeiro processadas e depois retransmitidas para

outras partes do sistema nervoso central (SNC) (SESSLE, 2000; SESSLE, 2005).

Os tecidos craniofaciais são quase exclusivamente inervados por ramos do nervo trigêmeo. Assim, a sensibilização dos nociceptores transmite o estímulo através das ramificações do nervo trigêmeo, cujo corpo celular se situa no gânglio trigeminal, para as estruturas superiores do sistema nervoso central, onde componentes do tronco cerebral participam da modulação e transmissão da informação nociceptiva (Figura 1). O complexo nuclear sensorial do tronco cerebral é subdividido no núcleo sensorial principal e no núcleo do trato espinhal, que consiste em três subnúcleos (oral, interpolar, caudal). Dentre as estruturas envolvidas nesse processo, destaca-se o subnúcleo caudal do trato espinhal do trigêmeo, que é o principal local de transmissão da informação nociceptiva da região orofacial, onde ocorre modulação e sensibilização dos neurônios de segunda ordem que podem ascender e estimular o tálamo e córtex cerebral, sendo interpretado, assim, como dor (Sessle, 2000; Sessle, 2005).

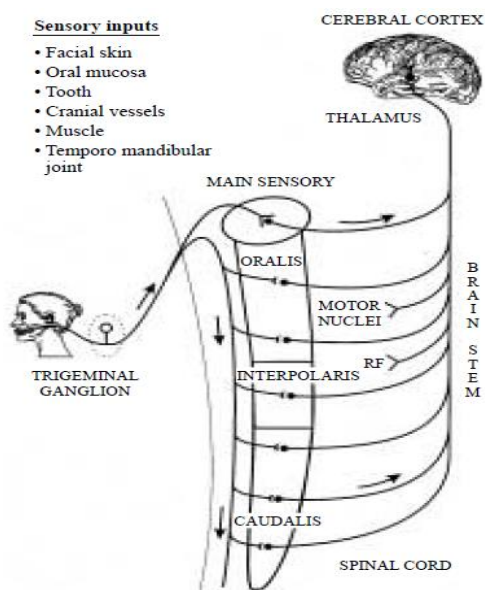


Figura 1A: Principal via somatossensorial da face e da boca. Aferentes primários trigêmeos se projetam através do gânglio trigeminal para neurônios de segunda ordem no complexo nuclear sensitivo do tronco cerebral trigeminal.

Barry J. Sessle , 2000.

Embora uma variedade de transtornos possa levar à dor orofacial, clínicos e pesquisadores estão particularmente interessados em distúrbios temporomandibulares (DTMs), que são uma classe frequentemente debilitante de distúrbios da dor (HAYLEY,CARLSON,2018).

2.2. Disfunção temporomandibular (DTM)

A associação americana de pesquisa odontológica (AADR) reconhece que as DTMs englobam um grupo de condições musculoesqueléticas e neuromusculares que envolvem as ATMs, os músculos mastigatórios e todos os tecidos associados (GREENE, 2010). Para fins instrucionais, a Academia Americana de Dor Orofacial (AAOP) classificou a DTM em dois grandes grupos: DTM muscular e articular.

Das dores que acometem a região orofacial, as DTMs estão em segundo lugar, com prevalência entre 5 e 15% da população, atrás apenas das dores de origem dentária (DE ROSSI *et al.*, 2014). Um estudo de Lipton *et al.* (1993) mostrou que cerca de 6% a 12% da população vivenciam sintomas clínicos de DTM e que 22% dos americanos relataram dor orofacial dentro de um período de 6 meses. No Brasil, as DTMs têm prevalência considerável, entre 3,7 % e 12 % da população, e impacto significativo nos fatores psicossociais (CONTI *et al.*, 2012).

Em 2014, o Instituto Nacional de Saúde e o Instituto Nacional de Pesquisa Dental e Craniofacial relataram que a prevalência de sinais e sintomas de desordem temporomandibular articular variou de 5 a 12%, com base em um levantamento feito através de vários estudos ao redor do mundo (GIANNAKOPOULOS *et al.*, 2010). Além disso, em um estudo de coorte prospectivo, a taxa de incidência de DTM de início foi de 3,9% ao ano. Em outras palavras, para cada 100 pessoas sem DTM inscritas, quase 4 indivíduos por ano desenvolveram a condição. (SLADE *et al.*, 2016)

Estudos recentes apontam uma maior prevalência de sintomas de DTM em mulheres do que em homens em proporções que podem variar entre 2:1 a 6:1, sendo a maior incidência na faixa etária entre a segunda e quarta década de vida (FERREIRA *et al.*, 2016; MANFREDINI *et al.*, 2011; SCHMID-SCHWAP *et al.*, 2013).

A DTM tem contribuído para um aumento de custos socioeconômicos, geralmente associados a comorbidades, como depressão e outros fatores psicológicos. Além disso, a perda de trabalho e de produtividade é uma questão importante a considerar nesses pacientes (REITER *et al.*, 2015; GIL-MARTÍNEZ *et al.*, 2016).

Apesar de a etiologia das DTMs não ser totalmente compreendida, sabe-se que está relacionada principalmente a fatores de risco como hábitos parafuncionais, predisposição genética, distúrbios do sono e estresse psicológico (SLADE *et al.*, 2016). A etiologia multifatorial das DTMs, foco de inúmeros estudos ao longo dos últimos anos, dificulta seu diagnóstico e consequentemente seu tratamento.

Os sinais mais relevantes de DTM são a presença de ruídos nas articulações (cliques e crepitações), redução da abertura da boca e limitação dos movimentos da mandíbula. No entanto, a dor é o principal problema desta patologia, e é tipicamente o motivo de esses pacientes procurarem tratamento (GAUER, 2015; Cairns *et al.* 2010; SUVINEN *et al.*, 2005). É provável que esta seja a razão pela qual a maioria dos estudos tem sido destinada a avaliar efetividade de várias medidas de intervenção relacionadas à dor como variável principal (GIL-MARTINEZ *et al.*, 2018).

A partir de um diagnóstico diferencial, preconiza-se inicialmente o tratamento conservador, que pode incluir farmacoterapia oral e injetável, placas oclusais, fisioterapia, terapia manual, exercícios, agulhamento seco, acupuntura, eletroterapia, terapia psicológica, técnicas de relaxamento e aconselhamento com estratégias de educação e auto-gestão da condição (GIL-MARTINEZ *et al.*, 2018). (OKESON, 2008; OSIEWICZ *et al.*, 2017).

Uma abordagem terapêutica adequada para tratar um paciente com DTM aponta principalmente para o alívio dos principais sinais e sintomas, sendo, as intervenções farmacológicas, bastante utilizadas para o alívio da dor e sintomas associados. A farmacoterapia tem como objetivo diminuir a dor e a inflamação na ATM e/ou músculos mastigatórios, tendo como resultado melhora da função e inibição da progressão da doença (CAIRNS *et al.*, 2010).

Os medicamentos mais comumente usados no tratamento da DTM são miorrelaxantes, anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), analgésicos, antidepressivos tricíclicos, benzodiazepínicos e corticosteroides (FREESMEYER *et al.*,2005). Embora os AINEs ou antidepressivos sejam eficazes em alguns pacientes, muitas vezes demoram a mostrar benefícios analgésicos plenos e possuem efeitos colaterais graves quando em uso prolongado, que, no caso dos AINEs, podem incluir exacerbação da hipertensão ou distúrbios gastrointestinais que pode levar a úlceras. Assim, devido a esta baixa efetividade no tratamento farmacológico da DTM, faz-se oportuno e necessária a busca por novos fármacos que possam ser mais efetivos (CAIRNS *et al.*, 2010).

2.3 Mediadores envolvidos na dor e inflamação da ATM

2.3.1. Citocinas

As estruturas da ATM são recobertas principalmente por cartilagem fibrosa. A superfície interna da cápsula articular é a membrana sinovial, que produz o líquido sinovial, o qual fornece nutrientes e metabólitos para os tecidos articulares não vascularizados, e a lubrificação articular (MOW, HOLMES, LAI, 1984).

A membrana sinovial contém células fagocitárias e imunológicas. Sendo assim, a redução da quantidade e/ou alteração na qualidade do líquido sinovial não só prejudica o suporte nutricional da cartilagem articular, mas também está associada à perda da matriz cartilaginosa (STEGENDA, 1989).

Sabe-se que na ocorrência de inflamação na membrana sinovial da ATM, vários biomarcadores, por exemplo, citocinas, eicosanoides, fatores de crescimento e as proteinases são secretadas no líquido sinovial da ATM (KELLESARIAN *et al.*,2016; ERNBERG, 2017).

Esses fatores, por sua vez, facilitam a expansão adicional da inflamação nos locais da ATM. Além disso, estudos *in vitro* têm mostrado que ocorre produção e secreção de citocinas ou quimiocinas inflamatórias pelos sinoviócitos ou sinoviócitos semelhantes a fibroblastos derivados de animais, humanos ou experimentais após estimulação com citocinas pró-inflamatórias,

como interleucina IL-1 β ou TNF- α (OGURA et al, 2002; TOBE et al, 2002; OGURA et al,2005; OGURA et al,2007; IBI et al, 2018).

Já a dor inflamatória aguda é caracterizada por hipernocicepção devido à sensibilização dos neurônios nociceptivos sensoriais primários, também denominados hiperalgisia ou alodinia (MILAN, 2003). Após a lesão tecidual, são liberados mediadores primários específicos que atuam nos receptores metabotrópicos neuronais da membrana para desencadear a ativação das vias do segundo mensageiro. Eicosanóides e aminas simpáticas são os mediadores principais mais importantes em última análise, responsáveis por hipernocicepção mecânica em ratos (FERREIRA,1979; NAKAMURA,1987; KHASAR, MCCARTER, LEVINE, 1999).

Na última década, foi mostrado que os estímulos inflamatórios não ativam diretamente a liberação de mediadores hipernociceptivos primários, mas sua liberação é precedida por uma cascata de citocinas (POOLE, CUNHA FERREIRA,1999). Isso foi demonstrado em ratos, onde a carragenina induz hipernocicepção mecânica através de uma cascata de citocinas liberadas por células residentes ou migrantes iniciadas pela produção de bradicinina (FERREIRA,LORENZETT,POOLE, 1993).

A homeostase da ATM é mantida através de uma complexa rede de moléculas celulares, incluindo citocinas, proteinases e outros mediadores inflamatórios, as quais afetam o metabolismo da matriz extracelular e alteram a expressão de genes e proteínas. Dessa forma, amplas matrizes de marcadores celulares são estudadas na DTM, a saber: Mediadores inflamatórios, como a família Interleucina, metaloproteinases da matriz, citocinas associadas à destruição óssea, mediadores apoptóticos e citocinas anti-inflamatórias (VERNAL et al, 2008).

As citocinas são pequenas proteínas produzidas e liberadas pelas células para promover comunicação, sendo, então, responsáveis por iniciar, manter e interromper os processos inflamatórios. Como tal, existe uma grande variedade de famílias de citocinas responsáveis por diferentes funções em diferentes áreas do corpo (ALSTERGREN, BENAVENTE, KOPP, 2003).

As citocinas podem ser categorizadas como pró-inflamatórias, por exemplo, interleucinas IL-1 β , IL-2, IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF α) ou anti-inflamatórias: IL-10 e interferon (IFN) (GOLDRING, 2000).

Nas doenças ou lesões inflamatórias das articulações, o balanço de citocinas no líquido sinovial é alterado, favorecendo as citocinas pró-inflamatórias (HUI et al, 2012). O conhecimento dos marcadores envolvidos na inflamação e destruição da ATM podem possibilitar uma terapia mais direcionada e resolutiva.

A primeira citocina liberada é o TNF, desencadeando a liberação de IL-6 IL-1 e neutrófilos induzidos por citocinas quimioatraentes-1 (CINC-1) responsável pela estimulação da síntese de prostaglandinas e liberação de aminas simpáticas (CUNHA et al,1991; CUNHA et al,1992; LORENZETTI et al, 2002).

O TNF- α é uma citocina pleiotrópica produzida por vários tipos de células, incluindo macrófagos e monócitos ativados. É um dos principais mediadores da regulação imune e da resposta inflamatória. A produção de TNF- α é estritamente controlada em células inativas, mas é rapidamente liberada por estímulo (VILCEK, LEE, 1991). Porém, a família mais numerosa e complexa de citocinas é a das interleucinas, onde existem mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios (PETERS JOESTING, Freund GG, 2013)

O sistema IL-1 inclui pelo menos 21 moléculas diferentes, as quais compõem os receptores de IL-1, co-receptores, ligantes e antagonistas endógenos. A família IL-1 consiste em três tipos de ligantes: IL-1 α e IL-1 β têm efeitos pró-inflamatórios, enquanto o antagonista do receptor de IL-1 (IL-1RA) inibe suas funções pró-inflamatórias, atuando como um inibidor competitivo de receptores. O intrincado equilíbrio das moléculas e receptores da família IL-1 tem um efeito profundo na homeostase da ATM. Muitos estudos indicaram que níveis mais altos de IL-1 α e IL-1 β estão presentes no líquido sinovial de pacientes que sofrem de DTM (KUBOTA et al, 1998.; KRISTENSEN et al, 2014).

Tendo em vista a literatura prévia sobre o assunto, Sorenson et al avaliaram estudos amplamente divergentes sobre a expressão da IL-1, concluindo que existe uma estabelecida associação da IL-1 com a DTM. A família IL-1 de citocinas, incluindo IL-1 α , IL-1 β e IL-1RA, foi encontrada em concentrações mais altas no líquido sinovial das articulações disfuncionais (AHMED et al, 2015; HAMADA et al, 2006 ; KIM et al, 2012)

Assim, durante os distúrbios da ATM, muitos mediadores pró-inflamatórios são produzidos e secretados por sinoviócitos e neutrófilos da ATM para o líquido sinovial da ATM. Entre elas, as citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β estão associadas à inflamação nas articulações sinoviais e à destruição do tecido conjuntivo. (AKUTSU M et al 2013)

Em contrapartida, sabe-se que existem mecanismos de inflamação protegidos e regulados mutuamente. Citocinas, como IL-1 β e TNF- α , podem degradar a cartilagem através da regulação positiva da expressão do gene de metaloproteinases (MMP) e diminuição das vias de síntese compensatória de condrocitos. As citocinas produzidas por sinoviócitos ativados, células mononucleares ou cartilagem articular têm seus antagonistas naturais. Formas solúveis de receptores do fator de necrose tumoral (sTNFR) podem neutralizar as atividades biológicas do TNF- α , e o IL-1RA é um inibidor natural da atividade da IL-1. Também existem citocinas anti-inflamatórias de ocorrência natural, como a IL-10, que inibem a síntese de IL-1 e TNF- α . (KACENA et al, 2001)

A il-10 é uma citocina anti-inflamatória (OPAL 2000), expressa por muitas células do sistema imunológico adaptativo, bem como por células da imunidade inata (SARAIVA; GARRA, 2010). Ela inibe as citocinas Th1, incluindo tanto a IL-2 quanto a IFN-g (DRIESSLER et al., 2004), além de desativar a síntese de citocinas pró-inflamatórias de monócitos/macrófagos (BRANDTZAEG 1996).

Além disso, vale salientar que na região da ATM, quando os nervos periféricos são ativados, ocorre a liberação de neuropeptídeos, como substância P (SP) e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), ambos correlacionados com a intensidade da dor, que podem evocar uma resposta inflamatória pela ativação de citocinas (por exemplo: IL-1, IL-6, TNF- α ,

IL-8, endotelina-1) e catabolismo do ácido araquidônico (KOSTRZEWA-JANICKA et al 2012; SATO et al, 2004; ASH et al, 1995)

2.3.2. Heme-oxigenase

A hemeo-xigenase (HO) é a enzima limitadora da taxa que catalisa a degradação do heme para liberar monóxido de carbono (CO), biliverdina (BVD) e ferro livre nas células de mamíferos (ALCARAZ et al., 2003). A HO-1 é induzido por estresse oxidativo ou nitrosativo, citocinas e outros mediadores produzidos durante processos inflamatórios, provavelmente como parte de um sistema de defesa em células expostas ao estresse, para fornecer um *feedback* negativo para a ativação celular e a produção de mediadores, que podem modular a resposta inflamatória (ALCARAZ et al., 2003).

HO-1 é induzida em uma variedade de células as endoteliais, monócitos/macrófagos, fibroblastos e neutrófilos (ALCARAZ et al., 2003; DATTA; LIANOS, 1999; OSHIRO et al., 1999; VICENTE et al., 2003). Um aumento da atividade da HO-1 nessas células exerce um importante papel no sistema de defesa antioxidante, na redução de radicais livres, na inibição da proliferação celular e da apoptose, reduzindo, também, 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). Sugere-se, então, um possível efeito anti-inflamatório da via da HO-1 e sabe-se que a atividade da HO regula negativamente os eventos inflamatórios.

Semelhante ao encontrado em pacientes, em modelo experimental de artrite aguda em camundongos, foi observado que a indução farmacológica de HO-1 reduziu edema articular, degradação da cartilagem e proliferação de tecidos inflamados articulares, além de reduzir níveis de IL-1 β , IL-6 e TNF α , a secreção de PGE2 e a atividade de MMP-9 (BENALLAOUA et al., 2007).

Nos últimos anos, nosso grupo demonstrou que a via HO / BVD / CO exerce efeitos antinociceptivos durante a hipernocicepção inflamatória da

articulação temporomandibular em ratos (CHAVES et al, 2018; COURA et al, 2017; VANDERLEI et al, 2011; FREITAS et al, 2016).

2.3.3. Óxido nítrico

A resposta do hospedeiro à infecção ou lesão inicia uma cascata de eventos envolvendo recrutamento de leucócitos e liberação de múltiplos mediadores inflamatórios. Um desses mediadores, o óxido nítrico (NO), é um importante agente microbicida na defesa do hospedeiro, mas também funciona como uma molécula efetora e sinalizadora biológica na inflamação e imunidade. (WAHL et al, 2003)

De um modo geral, a geração de NO é uma característica das células genuínas do sistema imunológico (células dendríticas, células NK, mastócitos e células fagocíticas, incluindo monócitos, macrófagos, microglia, células Kupffer, eosinófilos e neutrófilos), além de outras células envolvidas em reações imunológicas (BOGDAN, 2001).

O NO é gerado por meio de óxido nítrico sintase indutível (iNOS) que catalisa a oxidação de um nitrogênio guanidino associado à L-arginina. Enquanto óxido nítrico sintase (NOS) endotelial (eNOS) e NOS neuronal (nNOS) são expressas constitutivamente, o iNOS é induzido transcricionalmente por constituintes bacterianos e mediadores inflamatórios, incluindo TNF e IL-1 (MACMICKING et al, 1997).

A isoforma iNOS é regulada positiva ou negativamente pelo contato célula-célula (via adesão e moléculas co-estimulatórias), citocinas, complexos imunes, produtos microbianos e virais (proteínas, lipídios, polissacarídeos), poliaminas, ferro não ligado à ferritina, tensão de oxigênio, pH ambiental e vários antibióticos. Assim, com a liberação de citocinas e mediadores inflamatórios, há uma regulação positiva da expressão gênica para a iNOS (MACMICKING et al, 1997; BOGDAN, 2000)

Com base nesses dados, as isoformas constitutivas da NOS contribuem para a fisiopatologia da artropatia e iNOS pode funcionar, em parte, em uma via protetora. Uma quantidade crescente de evidências aponta a via

do NO-cGMP como crucial para o efeito antinociceptivo de muitos fármacos, em que a abertura dos canais K⁺ sensíveis a ATP induzem a hiperpolarização da membrana e reduz a despolarização e a capacidade de transmissão do potencial de ação dos neurônios, induzindo analgesia. (RODRIGUES,DUARTE, 2000; HERNÁNDEZ-PACHECO et al, 2008).

Estudos a respeito da função do NO tem demonstrado resultados que parecem paradoxais. Foi observado um benefício terapêutico notável com sinais e sintomas reduzidos de artrite erosiva após a inibição da produção de NO com inibidores não específicos da NOS (BEZERRA, BRAINS, GREENACRE, 2004). No entanto, a inibição seletiva da iNOS exacerba a inflamação sinovial e a degradação articular (WAHL et al, 2003).

Sabe-se então que o NO está envolvido nos processos patológicos e fisiológicos, e muitas linhas de evidência indicaram que o NO desempenha um papel complexo na modulação da dor, produzindo analgesia ou nocicepção, dependendo da dose e do modelo de dor utilizado (CURY et al, 2011).

2.4. Leite caprino

O leite e seus derivados parecem ter componentes potencialmente promotores de saúde que são exclusivos, estimulando o aumento na pesquisa, para investigar bioatividades, com destaque para as proteínas.

De um modo geral, leite e laticínios são frequentemente incluído como elementos importantes em uma dieta saudável e equilibrada. O leite é primeiro alimento para mamíferos e fornece toda a energia e nutrientes necessários para garantir o crescimento e desenvolvimento dos filhotes (KHALDI; HOLTON; SHIELDS, 2014). Estudos epidemiológicos vêm confirmando a importância nutricional do leite na dieta humana e reforçando o possível papel de seu consumo na prevenção de várias condições crônicas como doenças cardiovasculares, algumas formas de câncer, obesidade e diabetes (PEREIRA, 2013).

A demanda por leite caprino tem aumentado ultimamente e isso tem sido atribuído a aspectos relacionados ao seu consumo pela população de

áreas rurais, ao interesse de especialistas por produtos lácteos com características sensoriais diferenciadas, e à preocupação crescente da população em geral com a saúde, em busca de alimentos nutritivos, saudáveis e com propriedades funcionais (BOMFIM et al., 2011).

Algumas atividades biológicas relatadas para peptídeos derivados de proteínas lácteas vem despertando grande interesse dos pesquisadores pelo potencial que desempenham. Dentre elas, destaca-se: Atividade antibacteriana (ESMAELPOUR et al., 2016), inibição da enzima conversora de angiotensina, antioxidante (ABDEL-HAMID et al., 2017), opiácea, imunomodulatória (ERIKSEN et al., 2008), antitrombótica, hipocolesterolêmica (YAMAUCHI; OHINATA; YOSHIKAWA, 2003) e anti-hipertensiva (HERNÁNDEZ-LEDESMA, 2014).

O leite desempenha um papel vital na construção de uma sociedade saudável e pode ser usado como veículo para o desenvolvimento rural. A importância do leite de animais não bovinos está aumentando globalmente, devido à quantidade (15% da produção mundial de leite) e a fatores econômicos, culturais e ecológicos. Características nutricionais especiais foram reivindicadas para vários tipos de leite e produtos lácteos não bovinos (ZIMECK, KRUZEL, 2006)

Peptídeos lácteos apresentam grandes versatilidades fisiológicas e físico-químicas, características que podem colocá-los como constituintes promissores para incorporação em alimentos funcionais, suplementos dietéticos e formulações farmacêuticas direcionadas a doenças específicas (PATIL et al., 2015).

Os resultados promissores e a crescente busca por alimentos benéficos à saúde pelos consumidores no atual modelo sócio-econômico conduzem à necessidade de ampliar a exploração da funcionalidade do leite caprino. Tais detalhes suscitam a investigação de propriedades biológica como antinociceptiva e anti-inflamatória, atividades relevantes no que se refere a aspectos farmacológicos.

3. JUSTIFICATIVA

Apesar das vastas modalidades para o tratamento das DTMs, o seu manejo clínico é complexo e as terapias empregadas atualmente não são curativas, limitando-se a aliviar os sintomas da doença (CAIRNS et al., 2010).

A dificuldade no tratamento de condições inflamatórias nas DTMs associada à busca da melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na dor inflamatória tem intensificado as pesquisas por novos fármacos a partir de produtos naturais, como alternativa aos tratamentos convencionais (DO VAL et al., 2014).

Algumas substâncias como polissacarídeos sulfatados das algas *Gracilaria córnea* (COURA et al., 2017) e *Solieria filiformis* (ARAÚJO et al., 2017); e proteínas como a lectina de *Abelmoschus esculentus* (FREITAS et al., 2016) e da alga verde *Caulerpa cupressoides* (RIVANOR et al., 2018) apresentam atividade antinociceptiva em modelos de inflamação da articulação têmporo-mandibular de ratos. Contrariamente, ainda não há informações na literatura sobre a atividade relacionada com proteínas e peptídeos derivados de proteínas do leite caprino, o que torna pertinente a pesquisa nessa área. Alguns estudos têm sido realizados com as proteínas e peptídeos derivados do leite caprino, porém ainda são escassos, principalmente no que diz respeito ao leite de cabras criadas no semiárido brasileiro.

Dessa forma, torna-se válido investigar o potencial antinociceptivo e anti-inflamatório desses derivados do leite caprino, visto que a descoberta de novos agentes farmacológicos, bem como a elucidação dos seus mecanismos de ação, podem ajudar no tratamento dos pacientes com DTM dolorosa. Além de contribuir para o desenvolvimento socioeconômico do país de um modo geral, a busca de novos medicamentos a partir de produtos naturais, sendo eles de origem vegetal ou animal, representa uma alternativa para o desenvolvimento da indústria farmacêutica nacional.

4.OBJETIVOS GERAL E ESPECÍFICOS

4.1. Objetivo Geral:

Avaliar o efeito antinociceptivo e anti-inflamatório da fração caseínica do leite da cabra (FCN) e de seus hidrolisados, obtidos a partir da hidrólise com pepsina e tripsina (HDP e HDT, respectivamente) em um modelo de dor articular induzida por formalina na ATM de ratos.

4.2. Objetivos Específicos:

1. Investigar o efeito antinociceptivo de FCN, HDP e HDT no modelo de hipernocicepção induzida por formalina na ATM de ratos;
2. Entender o envolvimento da enzima hemeoxigenase-1 (HO-1) na antinocicepção induzida por HDP e HDT no modelo de hipernocicepção induzida por formalina na ATM de ratos;
3. Entender o envolvimento da via do óxido nítrico (NO) na antinocicepção induzida por HDP e HDT no modelo de hipernocicepção induzida por formalina na ATM de ratos;
4. Investigar o efeito anti-inflamatório de HDP e HDT através da avaliação imunohistoquímica para TNF α , IL-1 β e IL-10 na ATM e gânglio trigeminal no modelo de hipernocicepção induzida por formalina na ATM de ratos;

5. CAPÍTULO 1: Casein and its pepsin and trypsin hydrolysates of goat milk reduces temporomandibular joint inflammatory hypernociception in rats: Putative role for TNF- α , IL-1 β , and IL-10

Samilla Pontes Braga ¹, Mirna Marques Bezerra ^{4,7}, Maria Ester Frota Fernandes ¹, Sarah Rodrigues Basílio ³, Ariely Marques Oliveira de Meneses ³, Paula Perazzo de Souza Barbosa ², Carlos Alberto de Almeida Gadelha ², Tatiane Santi Gadelha ², Sebastiao Carlos de Sousa Oliveira ⁴, Dina Andressa Martins Monteiro ⁴, Manoel Vieira do Nascimento Junior ⁴, Tiago Sampaio dos Reis ⁴, Vicente de Paulo Teixeira Pinto ⁴, Karuza Maria Alves Pereira ⁵, Ellen de Assis Lima ⁶, Felipe Dantas Silveira ⁶, Joanna Trycia Magalhães Alexandre ¹, Hellíada Vasconcelos Chaves ^{3*}

¹ Health Sciences Graduate Programme, Federal University of Ceara. Avenida Comandante Maurocélío Rocha Pontes, 100 Derby – Zip code: 62.042-280 Sobral, Ceará, Brazil. (samillapontesbraga@gmail.com).

² Program in Food Science and Technology, Federal University of Paraiba, João Pessoa, PB, Brazil.

Department of Molecular Biology, Federal University of Paraiba, João Pessoa, PB, Brazil.

³ Faculty of Dentistry, Federal University of Ceara. Avenida Comandante Maurocélío Rocha Pontes, 100 Derby – Zip Code: 62.042-280 Sobral, Ceará, Brazil. (helliadachaves@yahoo.com.br)

⁴ Faculty of Medicine, Federal University of Ceara. Avenida Comandante Maurocélío Rocha Pontes, 100 Derby – Zip code: 62.042-280 Sobral, Ceará, Brazil.

⁵ Department of Morphology, School of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil.

⁶ Dentistry graduate program, Federal University of Ceara, Fortaleza, Ceará, Brazil.

⁷ Drug Research and Development Center (NPDM), Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil.

*Corresponding author

Helliada Vasconcelos Chaves. Faculty of Dentistry - Federal University of Ceará. Avenida Comandante Maurocéllo Rocha Pontes, 100, Derby – Zip Code: 62.042-280. Sobral - Ceará - Brazil Phone: +55 88-3611-2202 - Fax: +55 88-3611- 8000 E-mail: helliadachaves@yahoo.com.br.

Abstract

Temporomandibular Disorders (TMDs) is a group of musculoskeletal and neuromuscular conditions involving the temporomandibular joints (TMJs), the masticatory muscles and all associated tissues. As there are no records on the activity related to proteins derived from goat milk involving inflammation in the TMJs, this study investigated the antinociceptive activity of casein (FCN), obtained by isoelectric precipitation of goat milk at pH 4.1, and its hydrolysates, obtained by hydrolysis with pepsin and trypsin (HDP and HDT, respectively). Pre-treatment with casein (1 mg/kg), HDP (1 mg/kg), or HDT (1 mg/kg) significantly reduced the nociceptive behavioral response (56.8 ± 9.17 ; 78 ± 8.28 ; and 86.0 ± 5.91 , respectively) significantly reduced the nociceptive behavioral response, when compared to formalin group (177.7 ± 3.96). Although the efficacy of hydrolysates is independent of the HO-1 and NO pathways, their antinociceptive efficacy appear to depend on TNF α , IL-1 β and IL-10 involvement. In fact, both HDP and HDT reduced TNF- α and IL-1 β immunostaining in synoviocytes from synovial membranes and in trigeminal ganglion. Regarding IL-10, HDP increased IL-10 immunostaining in the synoviocytes from the TMJ synovial membrane and in the intercellular matrix. Also, HDT increased IL-10 immunostaining in both synovial membrane and trigeminal ganglion. Taken together our data suggest that the efficacy of casein fraction and its hydrolysates of goat milk in formalin-induced TMJ inflammatory hypernociception in rats involves, at least in part, TNF- α and IL-1 β inhibition, and IL-10 secretion. Thus, considering the safety profile of goat milk, we postulated that CNF, HDP, and HDT, could offer a novel way to treat TMJ pain.

Keywords: Goat milk; Temporomandibular joint; TNF- α ; IL-1 β ; IL-10.

Introduction

Among the orofacial pains, the Temporomandibular Disorders (TMDs) is a group of musculoskeletal and neuromuscular conditions involving the temporomandibular joints (TMJs), the masticatory muscles and all associated tissues (Greene, 2010), with a high incidence of 4% in the population (Slade et al, 2016). These dysfunctions, often associated with acute or persistent pain, can difficult chewing, speaking, or other orofacial functions, and their chronic forms may impair overall quality of life. (Ahmed et al., 2013).

Given its multifactorial etiology, the diagnosis and treatment of TMDs have been complex, initially advocating conservative treatment associated to pharmacology (Cairns, 2010). Due to the low effectiveness in the pharmacological treatment of this condition, it is opportune and necessary to search for new anti-inflammatory and analgesic candidate compounds.

Some substances studied by our group, such as sulphated polysaccharides from algae *Gracilaria cornea* (Coura et al., 2015, 2017) and *Solieria filiformis* (Araújo et al., 2017); lectins from *Abelmoschus esculentus* (Freitas et al., 2016, 2018) and green alga *Caulerpa cupressoides* (Rivanor et al., 2014; 2018); semi-synthetic molecules from *Moringa oleifera* (dos Santos et al., 2018) and extract from *Tephrosia toxicaria* (Do Val et al., 2014) showed antinociceptive activity in inflammatory models of rat TMJ.

In this field of natural products, it is increasing also studies with products from animal source. Many studies have identified and explored bioactive peptides in milk from different mammalian species, derived from caseins and whey, their two main protein groups (Salami et al., 2008). The goat milk proteins have high biological value and present in their composition peptides with different biological functions (García et al., 2014; Pereira, 2013), such as antioxidant (Ahmed et al., 2015), antimicrobial (Esmaeilpour et al., 2016), angiotensin enzyme inhibitor (Espejo-carpio et al., 2013) and anti-inflammation in rheumatoid arthritis (Rohmah, Widjajanto, Fatchiyah, 2015).

In contrast, there are no records on the activity related to proteins derived from goat milk involving inflammation in the TMJs, which makes a pertinent

research in this area. Thus, this study conducted here aimed to investigate the antinociceptive activity of casein and its pepsin and trypsin hydrolysates of goat milk.

Methods

Samples of goat milk

Goat milk samples were obtained from the Caprinoculture Sector of the Human, Social and Agricultural Sciences Center (CCHSA) of the Federal University of Paraiba (UFPB), Campus III, Bananeiras, Paraiba, Brazil. The goat milk was collected from confined animals, with a lactation period of 120 ± 2 days, which corresponds to the mature milk.

Preparation of goat milk proteins

The goat milk was skimmed by centrifugation and subjected to isoelectric precipitation with hydrochloric acid (HCl) at pH 4.1 (Ceballos et al. 2009), resulting in serum, the soluble fraction, and in the precipitate, corresponding to the casein fraction (CNF).

The CNF was washed with distilled water and solubilized with sodium hydroxide (NaOH) to quantify the soluble proteins by the Bradford method (1976). Posteriorly, the CNF was dialysed on cellulose membrane (cut-off 14 kDa) and dried by lyophilization in order to be used in the subsequent analyzes.

In vitro enzymatic hydrolysis of casein fraction of goat milk

The CNF of goat milk was submitted to enzymatic hydrolysis in vitro with pepsin and trypsin, separately. The CNF was solubilized in distilled water (1

mg/mL; m/v) and the pH adjusted to 2.5 with HCl for hydrolysis with pepsin, and pH 8.0 with NaOH for trypsin hydrolysis.

The solubilized and pH adjusted CNF was incubated with enzyme solution, at enzyme-to-substrate (E:S) ratio of 1:50 (v/v), at 39 °C and 38 °C for pepsin and trypsin, respectively, under 150 rpm for 2 h. The reactions were stopped with heating at 95 °C for 5 min, then placed on ice for 5 min to irreversibly inactivate of enzymes, followed by centrifugation at 10000 rpm. The supernatant was equivalent to the hydrolyzates of pepsin (HDP) and trypsin (HDT) which was dialysed on a cellulose membrane (cut-off 500 Da).

Antinociceptive activity

Experimentation animals

The experimental protocol was prepared according the “Guide for Care and Use of Laboratory Animals” of the Brazilian Society of Laboratory Animal Science and submitted and approved by the Animal Use Ethics Committee of University Federal of Ceara (UFC), Sobral, Ceara, Brazil (Ref. Number 05/17).

Male albino rats (*Rattus norvegicus*), Wistar variety (270-320 g), from the UFC central vivarium were used. The animals were kept in the UFC Sector Biottery, Sobral, until the beginning of the experiments, receiving water and feed ad libitum at 23 ± 2 °C and under light-dark cycles of 12 h.

Intra-articular Formalin Injection

The animals were briefly anesthetized by inhalation with isoflurane and received an intra-articular injection of the formalin, 1.5%, 50 µL (Roveroni et al., 2001) in the TMJ, with a 30 G-needle attached to a Hamilton microliter syringe (50 µL) through a P50 polyethylene tube. The needle was inserted into the

inferior portion of the posteroinferior border of the zygomatic arch of the left TMJ, and was advanced anteriorly until it contacted the posterolateral condyle region.

Behavioral test to evaluate nociceptive responses

Behavioral analyzes were performed during the clear phase, between 7h and 16h, in a quiet room with an ambient temperature of 23 ± 2 °C (Rosland, 1991). In order to minimize stress during the experimental sessions, the animals were previously manipulated for seven days. For behavioral analysis, an observation box (30 cm L x 30 cm W x 30 cm H) with a base and three mirrored sides and a glass front was used.

Each animal was initially placed and kept in the box for 10 min to get used to the environment and have stress minimized. Immediately after intra-articular injection, the conscious animal was returned to the observation chamber and behavioral responses were characterized by scratching the injected region with the front or rear paw; and by reflexively raising their heads. They were quantified for 45 min for formalin, divided into blocks of 3 min.

The time in seconds the animal remained scratching the orofacial region was quantified with a stopwatch, and the number of times that it reflexively raised its head was quantified by a cell counter. Considering that reflexively raising the head follows a duration uniform pattern of 1 s, the intensity of nociceptive response was quantified by adding this behavior to scratching the injected region, as previously standardized (Roveroni et al., 2001). Immediately after the behavioral analyzes, the animals were anesthetized and euthanized by decapitation so that biological tissues could be collected for further analysis.

Effect of CNF and hydrolysates on formalin-induced hypernociception in rat TMJ

Animals were orally pretreated (p.o.) with CNF at doses of 0.1 or 1 mg/kg. After 1h of pretreatment, they received intra-articular (i. art) formalin injection (1.5%; 50 µl), and the nociceptive behavioral response was quantified. The saline group received per vehicle (0.9% saline) 1 h before intra-articular injection of 0.9% sterile saline. The same protocol was followed with HDP and HDT, at doses of 0.1, 1 or 10 mg/kg.

The Formalin Group represents the animals that received the vehicle per saline (0.9% saline), followed 1 h after the injection of formalin. Immediately after the behavioral analyzes, the animals were anesthetized and euthanized by perfusion with PFA and PBS under anesthesia, so that biological tissues could be collected for further analysis.

HO-1 pathway involvement in hydrolysates-induced antinociception

Before 30 min of HDP (1 mg/kg; p.o.) or HDT (1 mg/kg; p.o.) administration, the animals were pretreated with ZnPP-IX (3 mg/kg, s.c.), a selective heme oxygenase 1 (HO-1) inhibitor, followed by an intra-articular formalin injection (1.5%; 50 µg). Nociception behavioral responses were assessed over a 45-minute observation period.

Role of the nitric oxide (NO) pathway in hydrolysates-induced antinociception

Before 1 h of HDP (1 mg/kg; p.o.) or HDT (1 mg/kg; p.o.) administration, rats were pretreated with aminoguanidine (30 mg/kg; i.p.), a selective inducible nitric oxide synthase (iNOS) inhibitor, followed by an intra-articular formalin injection (1.5%; 50 µg). Nociception behavioral responses were assessed over observation period of 45 min.

Role of TNF- α , IL-1 β , and IL-10 in hydrolysates-induced antinociception - Immunohistochemistry analysis

Paraffin blocks containing the temporomandibular joint and the trigeminal ganglion were prepared to obtain the histologic slides. These were reviewed to select “host pots” that included a specific area of the TMJ showing synovial membrane (SM), articular disc and condyle, and an area containing neural body of the trigeminal ganglia. We used these areas (diameter: 2 mm) to make a TMA block using a Tissue Microarrayer (Quick-Ray UNITMA®). Then, microscopic slides (4 μ m) were prepared conventional haematoxylin-eosin method and for immunohistochemistry, which were cut into 3- μ m thick sections, which were placed on silanized slides and processed. Briefly, the samples were deparaffinized, rehydrated and subjected to antigen recovery using a citrate buffer at a pH of 6.0 (anti-TNF- α , anti-IL-1 β , and anti-IL-10). To inactivate endogenous peroxidase, the specimens were incubated (30 minutes) with 3% H₂O₂ in phosphate-buffered solution (PBS), washed in PBS and incubated overnight with primary antibodies directed against anti-TNF- α (1:100, monoclonal; Abcam® ab6671), anti-IL-1 β (1:150, monoclonal, Abcam®, ab9722) and anti-IL-10 (1:150, monoclonal, Abcam®, ab79056). After washing in PBS, the samples were incubated in Envision Plus HRP anti-IgG rabbit/mouse for 30 minutes (ready-to-use; monoclonal; Dako® K4065) and washed again in PBS. Then, diaminobenzidine chromogen (Dako® K3469) was applied to the specimens for 5 minutes. Harris' hematoxylin was used as a counterstain (10 s), after which the specimens were dehydrated (using ethanol and xylene) and cover-slipped using a permanent mounting medium (Enthelam®). Parallel sections of the negative control were treated with antibody diluent instead of a primary antibody.

Statistical analysis

In order to evaluate the distribution of samples, the Shapiro-Wilk test was carried out. The outliers have been removed. To analyze the associations between the variables, the means were compared using one-way ANOVA. The post-hoc test was defined from the analysis of variance homogeneity through the Levene test. If there was homogeneity of variances (p -value ≥ 0.05), the Tukey post-test was used. If there was no homogeneity of variance between the data (p -value < 0.05), the Games-Howell test was performed.

Results were expressed as means \pm standard error of the mean (S.E.M). All analyzes were performed using the SPSS 20.0 program for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). The graphics were made with GraphPad Prism 6 software for Windows (GraphPad Prism, La Jolla, CA, USA). The probability level (p -value) was assumed to be $p < 0.05$.

Results

Effect of CNF and hydrolysates on formalin-induced hypernociception in rat TMJ

Intra-articular administration of formalin nociceptive agent (1.5%; 50 μ L) to the left TMJ of rats increased ($P < 0.0001$) the behavioral nociceptive response (177.2 ± 3.96) compared to the saline group (79.67 ± 5.04).

The pretreatment with goat milk CNF at the dose of 1 mg/kg reduced (56.8 ± 9.17) the nociceptive behavioral response, when compared to the formalin group (Fig. 1). Similarly, the pretreatment with HDP at dose of 1 mg/kg (78 ± 8.28) or 10 mg/kg (85.8 ± 15.25) reduced the behavioral nociceptive response ($P < 0.0001$), when compared to the formalin group (Fig. 2). Further, the pretreatment with HDT at the dose 0.1 mg/kg (110.5 ± 19.19), 1 mg/kg (86.0 ± 5.91), or 10 mg/kg (70.1 ± 6.34) reduced the behavioral nociceptive response significantly ($P < 0.0001$), when compared to the formalin group (Fig. 3).

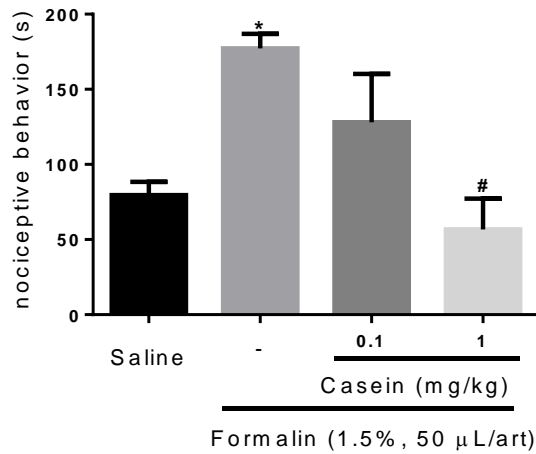


Fig. 1. Effect of CNF in inflammatory hypernociception induced by formalin 1.5% in the TMJ of rats. The formalin injection (1.5%; i.art.; 50 µL) induced a hypernociception response compared to the saline group 1 h after the inflammatory stimulus was applied. Casein at a dose of 1 mg / kg reduced the nociceptive behavioral response. * p <0.05 in relation to the saline group and #p <0.05 in relation to the formalin group (ANOVA, Games-Howell).

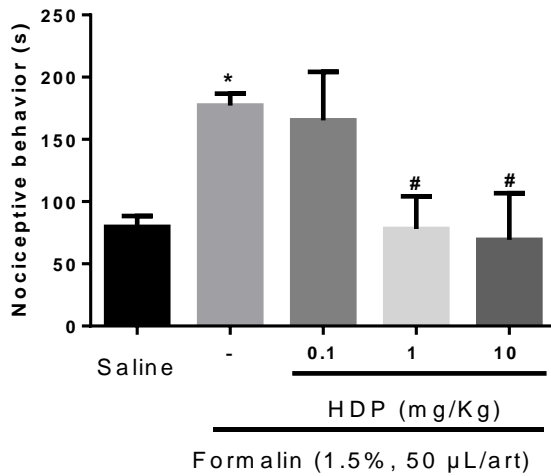


Fig. 2. Effect of HDP in inflammatory hypernociception induced by formalin 1.5% in the TMJ of rats.

The formalin injection (1.5%; i.art.; 50 µL) induced an inflammatory hypernociception response compared to the saline group 1 h after the inflammatory stimulus was applied. Treatment with HDP hydrolyzate at a dose of 1 mg / kg reduced the nociceptive response. * p <0.05 in relation to the saline group and #p <0.05 in relation to the formalin group (ANOVA, Tukey).

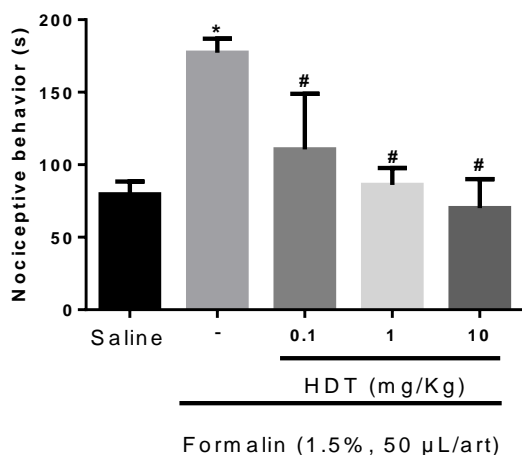


Fig. 3. Effect of HDT in inflammatory hypernociception induced by formalin 1.5% in the TMJ of rats.

The formalin injection (1.5%; i.art.; 50 μ L) induced an inflammatory hypernociception response compared to the saline group 1 h after the inflammatory stimulus was applied. Treatment with HDT hydrolyzate at a dose of 1 mg / kg reduced the nociceptive response. * $p < 0.05$ in relation to the saline group and # $p < 0.05$ in relation to the formalin group (ANOVA, Tukey).

Herein we found that both casein and its hydrolysates (HDP and HDT) of goat milk reduces temporomandibular joint inflammatory hypernociception in rats. Considering that milk proteins subjected to hydrolysis may show promising results in the search for new medications, the next experiments were performed in order to find out the mechanism of action of both HDP and HDT. The working doses were determined 1 mg/kg for both HDP and HDT.

HO-1 pathway involvement on hydrolysates efficacy during formalin-induced hypernociception in rat TMJ

Intra-articular administration to the left TMJ of rats of the formalin nociceptive agent (1.5%; 50 μ L) (177.2 ± 3.96) resulted in a statistically significant ($P < 0.0001$) increase in behavioral nociceptive response in comparison with the saline group (79.67 ± 5.04). In rats receiving ZnPP-IX (3 mg/kg, sc), a selective HO-1 inhibitor 30 min prior to pretreatment with HDP or HDT (1 mg/kg; p.o.), there was no reversal of the antinociceptive effect of the compounds ($85,25 \pm 115.5$ and 67.8 ± 15.26 , respectively; $P < 0.0001$),

indicating that the action of hydrolysates is independent of the HO-1 pathway (Fig. 4 A and B).

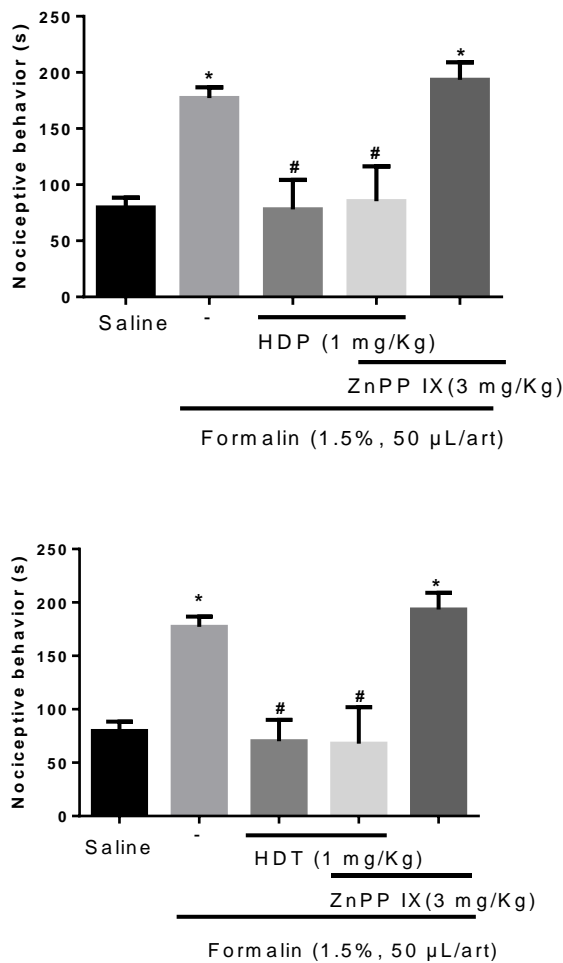


Fig. 4 A and B. Effects of ZnPP-IX in the antinociceptive efficacy of hydrolysates on inflammatory hypernociception induced by 1.5% formalin in the ATM of rats.

The formalin injection (1.5%; i.art; 50 µL) induced an inflammatory hypernociception response compared to the saline group 1 h after the inflammatory stimulus was applied. The treatment with goat milk hydrolyzate HDP and HDT reduced the nociceptive response, an effect that was not reversed by the administration of HO-1 inhibitors. * $p < 0.05$ in relation to the saline group and # $p < 0.05$ in relation to the formalin group (ANOVA, Tukey).

Role of the nitric oxide (NO) pathway on hydrolysates efficacy during formalin-induced hypernociception in rat TMJ

Intra-articular administration of formalin nociceptive agent (1.5%; 50 µL) to the left TMJ of rats (177.2 ± 3.96) resulted in a statistically significant ($p <$

0.0001) increase in behavioral nociceptive response in comparison with the saline group (79.67 ± 5.04). In rats receiving aminoguanidine (30 mg / kg; ip), a selective iNOS inhibitor 1 h before pretreatment with HDP or HDT (1 mg/kg; p.o.), there was no reversal of the antinociceptive effect of the compounds (75.0 ± 6.09 and 78.0 ± 6.15 , respectively; $p < 0.0001$), indicating that the action of hydrolysates is independent of the nitric oxide (NO) pathway (Fig. 5 A and B).

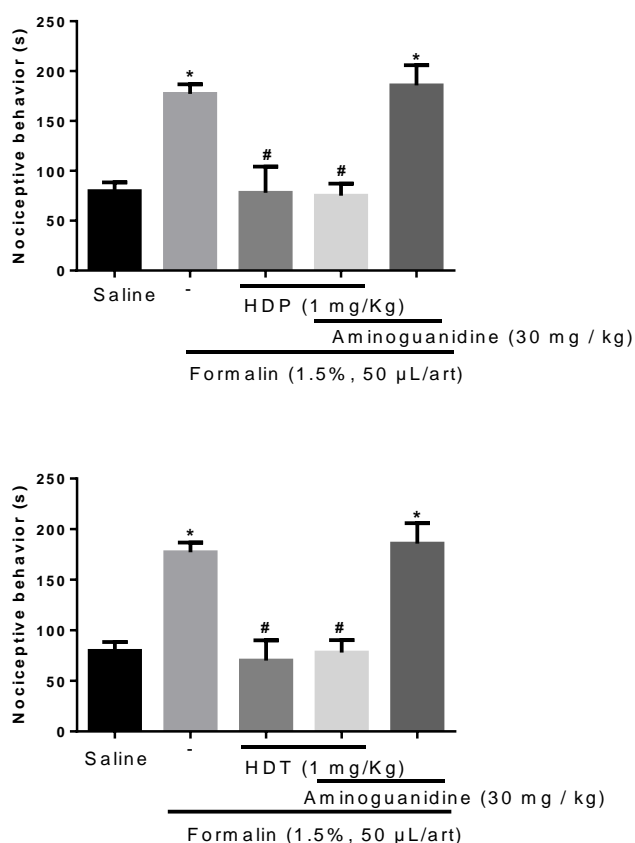


Fig. 5 A and B. Effects of aminoguanidine in the antinociceptive efficacy of hydrolysates on inflammatory hypernociception induced by 1.5% formalin in the ATM of rats.

The formalin injection (1.5%; i.art; 50 µL) induced an inflammatory hypernociception response compared to the saline group 1 h after the inflammatory stimulus was applied. The treatment with HDP and HDT hydrolysates in goat milk reduced the nociceptive response, an effect that was not reversed with the previous administration of the NO pathway inhibitor. * $p < 0.05$ in relation to the saline group and # $p < 0.05$ in relation to the formalin group (ANOVA, Games-Howell).

TNF- α , IL-1 β , and IL-10 involvement on hydrolysates efficacy during formalin-induced hypernociception in rat TMJ

Immunohistochemical analysis for TNF- α showed an increase in TNF- α expression in the formalin group in synoviocytes from synovial membranes (Figure 6F), and in peripheral nerves from primary afferent neurons (Figure 6J), particularly in the axon and perineurium. Also, it was observed in formalin group increased TNF- α immunostainings in the trigeminal ganglion (Figure 6N), particularly in the cell body of primary afferent neuron and glial satellite cells. These immunostainings were reduced in both HDP (Figures 6G, 6K, and 6O, respectively), and HDT (Figures 6H, 6L, and 6P, respectively) groups.

Considering immunohistochemical analysis for IL-1 β , it was found increased immunostaining in the formalin group in both synoviocytes from synovial membrane (Figures 7B, and 7F), and in the trigeminal ganglion (Figure 7N), particularly in the cell body of primary afferent neuron and glial satellite cells. These immunostainings were reduced in both HDP (Figures 7G, and 7O respectively) and HDT (Figures 7D/7H, and 7O respectively) groups.

Regarding IL-10, formalin group did not show increased immunostaining for this anti-inflammatory cytokine. However, HDP group showed increased immunostaining for IL-10 in the synovial cells from the TMJ synovial membrane, as well as in the intercellular matrix (Figures 8C, and 8G). Further, the treatment with HDT increased the immunostaining for IL-10 not only in the TMJ synovial membrane (Figures 8D, and 8H), but in the trigeminal ganglion (Figure 8P).

Discussion

This study revealed that the administration of casein fraction of goat milk (CNF) and its hydrolysates, produced by enzymatic hydrolysis in vitro with pepsin (HDP) and trypsin (HDT), reduce the inflammatory pain in the TMJ of rats, and that the antinociceptive efficacy these compounds appear to depend, at least in part, on the involvement of TNF α , IL-1 β and IL-10. In addition, our results also suggest that the effects of these compounds on inflammatory pain

in the TMJ of rats do not appear to depend on the NO pathway or on the heme oxygenase pathway.

Goat milk has beneficial effects on human health, already recognized by the scientific community (Palatnik et al., 2015). Among the milk components which can positively affect organic function are the proteins (Bhat, Kumar and Bhat, 2015), with antimicrobial, anti-inflammatory, hypocholesterolemic or hypertension control effects already recorded in the literature (Esmailpour et al., 2016; Eriksen et al., 2008; Yamauchi, Ohinata and Yoshikawa 2003; Hernández-ledesma, 2014).

Heme-oxygenase (HO) is the rate-limiting enzyme that catalyzes the degradation of heme to release carbon monoxide (CO), biliverdin (BVD) and free iron in mammalian cells (Alcaraz et al., 2003). HO-1 is induced by oxidative or nitrosative stress, cytokines and other mediators during inflammatory processes, probably as part of a defense system in cells exposed to stress, to provide negative feedback for cell activation and the production of mediators, that can modulate the inflammatory response (Alcaraz et al., 2003). Over the last few years, our group have demonstrated that HO/BVD/CO pathway plays antinociceptive effects during temporomandibular joint inflammatory hypernociception in rats (Chaves et al, 2018; Coura et al, 2017; Vanderlei et al, 2011; Freitas et al, 2016) However, in the present study, after the pretreatment with ZnPP IX, a specific HO-1 inhibitor, the efficacy of both pepsin (HDP) and trypsin (HDT) hydrolysates was unchanged, suggesting that HO-1 activity is not involved in the inhibitory effects of pepsin (HDP) and trypsin (HDT) hydrolysates. Given these results, we continue in an attempt to answer the mechanisms of action of both pepsin (HDP) and trypsin (HDT) hydrolysates.

A huge number of inflammatory mediators have been suggested to play a role in temporomandibular joint disorders. Among these, NO, a small free radical, has critical signaling roles in immunological, inflammatory, and nociceptive processes. In formalin-induced hypernociception in TMJ in rats, the NO inhibitor, aminoguanidine, which is a specific inhibitor of iNOS, increased the nociceptive behavior, when compared to formalin group, showing that in this model NO has anti-nociceptive effect. In order to explain the putative mechanism of action of HDP and HDT, aminoguanidine, was administered,

being followed by the HDP or HDT, which did not reduce its effectiveness, suggesting that the NO pathway integrity is not required for HDP and HDT mechanism of action. These results appear paradoxical but we would consider that within inflamed joints activated cells (neutrophils, macrophages) can secrete a plethora of inflammatory mediators, then amplifying the inflammatory response. Further, NO is involved in both pathological and physiological processes, and many lines of evidence have indicated that NO plays a complex role in the modulation of pain, producing either analgesia or nociception, depending on the dose and the pain model used (Cury et al, 2011).

During TMJ disorders, besides NO, many inflammatory mediators are produced and secreted from TMJ synoviocytes and neutrophils to synovial fluid of TMJ. Among them, the proinflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β are associated with inflammation in synovial joints and connective tissue destruction. On the other hand, IL-10 acts as inhibitors to these proinflammatory cytokines (Kacena MA et al, 2001). Fortunately, communication network of pro- and anti-inflammatory cytokines maintains the homeostasis of the TMJ (Sorenson et al, 2018). In the present study, we investigated the involvement of TNF- α and IL-1 β , and IL-10 on the hydrolysates (HDP and HDT) efficacy during formalin-induced hypernociception in rat TMJ.

Our research group demonstrated that intra-TMJ injection of formalin, which is a noxious stimulus commonly used to investigate the efficacy of analgesic and anti-inflammatory compounds in pre-clinical behavioral trials, was associated with increased levels of TNF- α in the TMJ tissue, trigeminal ganglion, and subnucleus caudalis compared with saline group (Alves et al, 2018). High TNF- α levels were found in symptomatic TMJs when compared with normal ones (Nordahl, Alstergren and Kopp, 2000; Emshoff et al, 2000). Further, some authors demonstrated that therapy with TNF α inhibitors have improved the outcomes of treatment for rheumatoid arthritis (RA) (Sikorska et al, 2019). Our current data revealed that both HDP and HDT reduced TNF α immunostaining in synovial cells of the TMJ synovial membrane, in the peripheral nerve, as well as, in the primary afferent neuron cell body, and in glial cells in the trigeminal ganglion, suggesting antinociceptive and anti-inflammatory activity involving the peripheral nervous system.

Two studies have shown that the most representative pro-inflammatory cytokines in the synovial fluid of patients with TMD are TNF- α IL-1 β (Kellesarian et al, 2016; Nordahl, Alstergren and Kopp, 2000). In this regard, similar to that observed for TNF- α , our research group demonstrated that the intra-TMJ injection of formalin significantly increased the release of IL-1 β in periarticular tissues, in relation to sham groups (Rivanor et al, 2018). Cytokines from glial cells may play important roles in glial-neuron communication, which contributes to pain hypersensitivity. In fact, after inflammation or nerve damage, inflammatory mediators released from nerve terminals activate glial cells, which release a diversity of mediators (such as cytokines, including IL-1 β) that in turn affect neuronal activity (Ren and Dubner, 2008) (Guo et al ,2007). Notably, it was demonstrated that satellite glial cell activation in the trigeminal ganglionic modulates neuronal excitability via IL-1 β post-inflammation (Takeda et al, 2007). Also, some authors suggested how IL-1 β contributes to TMJ inflammatory hypernociception, showing evidence that glial IL-1 β upregulated neuronal Nav1.7 expression in the trigeminal ganglionic via the crosstalk between signaling pathways of the glial IL-1 β / COX-2/PGE2 and the neuronal EP2/PKA/CREB/Nav1.7 (Zhang et al, 2018). Our present data show that both hydrolysates (HDP and HDT) reduced IL-1 β immunostaining in synovial membrane, and in trigeminal ganglion, when compared to formalin group. Pharmaceutical blockade of IL-1 activity has been used to successfully treat diseases of the joints, bones and muscles, such as rheumatoid arthritis, erosive osteoarthritis and traumatic joint injuries (Dinarello, Simon and Van der Meer, 2012). Bearing in mind that the specific targeting of pathological mediators, including the IL-1 cytokine family, can significantly reduce inflammation and prevent further TMJ degeneration (Sorenson et al, 2017), the above results suggest a possible role of cytokines in the pathogenesis of TMD.

Fortunately, the inflammatory response is a well-orchestrated and strictly regulated event, so in the inflammatory milieu, anti-inflammatory cytokines also are secreted, such as IL-10, which may inhibits the synthesis of IL-1 β and TNF- α , providing a negative feedback for cell activation and the production of inflammatory mediators, which could modulate, at least partially, the inflammatory pain process. Our research group demonstrated that intra-TMJ

injection of formalin significantly decrease the levels of IL-10 in the trigeminal ganglion and subnucleus caudalis, when compared to saline-injected group (Coura et al, 2017). In present study, we demonstrated that the administration of both HDP and HDT increased immunostaining for IL-10 in the synovial membrane and in the trigeminal ganglion. IL-10 is a powerful anti-inflammatory cytokine with a wide spectrum of biological effects, expressed by many cells of the adaptive immune system, as well as by innate immunity cells (Saraiva and Garra, 2010). It inhibits Th1 cytokines, including both IL-2 and IFN-g (Driessler et al, 2004), in addition to disabling the synthesis of monocyte/macrophage pro-inflammatory cytokines (Brandtzaeg 1996).

Taken together our data suggest that the efficacy of casein fraction and its hydrolysates of goat milk in formalin-induced TMJ inflammatory hypernociception in rats involves, at least in part, TNF- α and IL-1 β inhibition, and IL-10 secretion.

The production of peptides by hydrolysis appears to be a promising technique. This study is the first to evaluate whether casein fraction of goat milk (CNF), and its hydrolysates, produced by enzymatic hydrolysis in vitro with pepsin (HDP) and trypsin (HDT), can inhibit nociceptive response in a formalin challenge rat model. Thus, considering the safety profile of goat milk, we postulated that CNF, HDP, and HDT, could offer a novel way to treat TMJ pain. We trust that our results may support in the understanding of TMJ inflammatory pain and the development of a new strategy to deal with this disorder.

Funding

This work was supported by Brazilian grants from Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) (grant #471974/2013-7), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) and Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Funcap) (Capes/Funcap grant # AE1-0052-000180100/2011), and Instituto de Biomedicina do Semi-Árido Brasileiro (INCT-IBISAB). Hellíada Vasconcelos Chaves, Mirna Marques Bezerra, and Karuza Maria Alves Pereira are Senior Investigators of

CNPq/Brazil. Vicente de Paulo Teixeira Pinto is investigator of Funcap/Ceara/Brazil.

References

Ahmed N, Mustafa HM, Catrina AI, Alstergren P (2013) Impact of Temporomandibular Joint Pain in Rheumatoid Arthritis. *Mediat Inflamm* 2013:1-7. <https://doi.org/10.1155/2013/597419>.

Alcaraz, M.J, Fernandez, P, Guillen, MI. Anti-inflammatory actions of the heme oxygenase-1 pathway. *Curr Pharm Desig* (9): 2541–2551, 2003.

Alves SM et al (2018) The efficacy of a lectin from *Abelmoschus Esculentus* depends on central opioid receptor activation to reduce temporomandibular joint hypernociception in rats. *Biomed Pharmacother* 101: 478-484. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.02.117>

Araújo IWF, Chaves HV, Pachêco JM et al (2017) Role of central opioid on the antinociceptive effect of sulfated polysaccharide from the red seaweed *Solieria filiformis* in induced temporomandibular joint pain. *Int Immunopharmacol* 44:160-167. Doi: 10.1016/j.intimp.2017.01.005.

Bhat, Z. F.; Kumar, S.; Bhat, H. F. Bioactive peptides of animal origin: a review. *Journal of Food Science and Technology*, v. 52, v. 9, p. 5377-5392, 2015.

Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254. DOI: 10.1006/abio.1976.9999.

Brandtzaeg P, Osnes L, Ovstebø R, Joø GB, Westvik AB, Kierulf P (1996). Net inflammatory capacity of human septic shock plasma evaluated by a monocyte-based target cell assay: identification of interleukin-10 as a major functional deactivator of human monocytes. *J. Exp. Med.*, 184: 51-60.

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

Ceballos SL, Morales ER, Adarve GT et al (2009) Composition of goat and cow milk produced under similar conditions and analyzed by identical methodology. *J Food Compos Anal* 22:322–329. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2008.10.020>.

Chaves, HV (2018) Heme oxygenase-1/biliverdin/carbon monoxide pathway downregulates hypernociception in rats by a mechanism dependent on cGMP/ATP-sensitive K⁺ channels. *Inflammation Research* <https://doi.org/10.1007/s00011-018-1133-z>.

Coura CO, Chaves HV, do Val DR et al (2017) Mechanisms involved in antinociception induced by a polysulfated fraction from seaweed *Gracilaria cornea* in the temporomandibular joint of rats. *Int J of Biol Macromol* 97:76-84. Doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.01.017.

Cury Y, Picolo G, Gutierrez VP, Ferreira SH (2011) Pain and analgesia: The dual effect of nitric oxide in the nociceptive system. *Nitric Oxide* 25:243–254. Doi:10.1016/j.niox.2011.06.004.

Dinarello CA, Simon A, Van Der Meer JW (2012) Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. *Nat*, 11: 633-652.

Do Val DR (2014) *Tephrosia toxicaria* Pers. reduces temporomandibular joint inflammatory hypernociception: The involvement of the HO-1 pathway. *Eur J Pain* 18: 1280-1289. Doi: 10.1002/j.1532-2149.2014.488.x.

Dos Santos AO (2018) Antinociceptive, anti-inflammatory and toxicological evaluation of semi-synthetic molecules obtained from a benzyl-isothiocyanate isolated from *Moringa oleifera* Lam. in a temporomandibular joint inflammatory hypernociception model in rats. *Biomed & Pharmacother* 98: 609-618. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.12.102.

Driessler F, Venstrom K, Sabat R, Asadullah K, Schottelius AJ (2004) Molecular mechanisms of interleukin-10-mediated inhibition of NF- κ B activity: a role for p50. *Clin Exp Immunol* 135: 64-73. Doi: 10.1111/j.1365-2249.2004.02342.x.

Emshoff, R et al (2000) Temporomandibular joint pain: relationship to internal derangement type, osteoarthritis, and synovial fluid mediator level of tumor necrosis factor- α . Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod., v. 90, p. 442-449.

Eriksen EK, Vegarud GE, Langsrud T, Almaas H, Lea T (2008) Effect of milk proteins and their hydrolysates on in vitro immune responses. Small Ruminant Res 79:29-37. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.11.004>.

Esmailpour M, Reza Ehsani M, Aminlari M et al (2016) Antimicrobial activity of peptides derived from enzymatic hydrolysis of goat milk caseins. Comp Clin Path 25:599-615. DOI: 10.1007/s00580-016-2237-x.

Espejo-Carpio FJ, Pérez-Galvez R, Guadix EM, Guadix A (2013) Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of enzymatic hydrolysates of goat milk protein fractions. Int Dairy J 32:175-783. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.04.002>.

Freitas RS, do Val DR, Fernandes MEF (2016) Lectin from *Abelmoschus esculentus* reduces zymosan-induced temporomandibular joint inflammatory hypernociception in rats via heme oxygenase-1 pathway integrity and tnf- α and il-1 β suppression. Int Immunopharmacol 38:313-323. Doi: 10.1016/j.intimp.2016.06.012.

García V, Rovira S, Boutoial K, López MB (2014). Improvements in goat milk quality: a review. Small Ruminant Res 121:51-57. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2013.12.034>.

Greene CS (2010). Managing patients with temporomandibular disorders: A new “standard of care”. Am J Orthod Dentofacial Orthop 138:3-4. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ajodo.2010.04.015>.

Guo W, Wang H, Watanabe M, Shimizu K, Zou S, LaGraize SC, Wei F, Dubner R, Ren K (2007) Glial-cytokine-neuronal interactions underlying the mechanisms of persistent pain. J Neurosci 27:6006–6018. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0176-07.2007.

Hernández-Ledesma B, García-Nebot MJ, Fernández-Tomé S, Amigo L, Recio I (2014) Dairy protein hydrolysates: Peptides for health benefits. *Int Dairy J* 38:82-100. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.11.004>.

Kacena MA, Merrel GA, Konda SR, Wilson KM, Xi Y, Horowitz MC (2001) Inflammation and bony changes at the temporomandibular joint. *Cells Tissues Organs* 3:257–264. doi:10.1159/000047889.

Kellesarian SV et al (2016) Cytokine profile in the synovial fluid of patients with temporomandibular joint disorders: A systematic review. *Cytokine* 77 (2016) 98–106.

Nordahl, S, Alstergren P and 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*.

Palatnik, DR et al. Recovery of caprine whey protein and its application in a food protein formulation. *LWT-Food Science and Technology*, v. 63, n. 1, p. 331-338, 2015.

Pereira PC (2013) Milk nutritional composition and its role in human health. *Nutrition* 30:619-627. Doi: 10.1016/j.nut.2013.10.011.

Ren K, Dubner R (2008) Neuron-glia crosstalk gets serious: role in pain hypersensitivity. *Curr Opin Anaesthesiol*. 21:570–579. Doi 10.1097/ACO.0b013e32830edbfd.

Rivanor RLC et al (2018). A lectin fraction from green seaweed *Caulerpa cupressoides* inhibits inflammatory nociception in the temporomandibular joint of rats dependent from peripheral mechanisms. *International Journal of Biological Macromolecules*.115 (2018) 331–340.

Rohmah RN, Widjajanto E, Fatchiyah F (2015). Protective effect of CSN1S2 protein of goat milk on ileum microstructure and inflammation in rat-CFA-induced rheumatoid arthritis. *Asian Pac J Trop Dis* 5:564-568. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(15\)60837-4](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(15)60837-4).

Rosland, J.H., 1991. The formalin test in mice: The influence of ambient temperature. *Pain* 45, 211–216. doi:10.1016/0304-3959(91)90190-9.

Roveroni, R.C., Parada, C. a., Cecília, M., Veiga, F. a., Tambeli, C.H., 2001. Development of

a behavioral model of TMJ pain in rats: The TMJ formalin test. *Pain* 94, 185–191. doi:10.1016/S0304-3959(01)00357-8.

Salami M, Yousefi R, Ehsani MR et al (2008) Kinetic characterization of hydrolysis of camel and bovine milk proteins by pancreatic enzymes. *Int Dairy J* 18:1097-1102. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.06.003>.

Sikorska D, Kawka E, Rutkowski R, Samborski W, Witowski J (2019) The intensity of joint pain in relation to changes in serum TNF α during therapy with anti-TNF α inhibitors. *Inflammopharmacology*. 27:679–683. doi:10.1007/s10787-019-00564-x.

Slade GD et al (2016). Painful Temporomandibular Disorder: Decade of Discovery from OPPERA Studies. *Journal of Dental Research* 2016, Vol. 95(10) 1084 –1092 © International & American Associations for Dental Research 2016 Reprints and permissions: sagepub.com/journalsPermissions.nav DOI: 10.1177/0022034516653743.

Sorenson A et al (2017). Expression of Interleukin-1 and temporomandibular disorder: Contemporary review of the literature. *Cranio*. 36:268–272. doi:10.1080/08869634.2017.1342890.

Takeda M, Tanimoto T, Kadoi J, Nasu M, Takahashi M, Kitagawa J, Matsumoto S (2007) Enhanced excitability of nociceptive trigeminal ganglion neurons by satellite glial cytokine following peripheral inflammation. *Pain*.129:155–66. DOI: 10.1016/j.pain.2006.10.007.

Vanderlei ESO (2011) The involvement of the HO-1 pathway in the anti-inflammatory action of a sulfated polysaccharide isolated from the red seaweed *Gracilaria birdiae*. *Inflamm. Res*. DOI 10.1007/s00011-011-0376-8.

Yamauchi, R; Ohinata, K; Yoshikawa, M. Beta-lactotensin and neurotensin rapidly reduce serum cholesterol via NT2 receptor. *Peptides*, v. 24, n. 12, p. 1955-1961, 2003.

Zhang P (2018) Glial interleukin-1 β upregulates neuronal sodium channel 1.7 in trigeminal ganglion contributing to temporomandibular joint inflammatory hypernociception in rats. *J Neuroinflammation*.15:1-16. doi:10.1186/s12974-018-1154-0.

6. REFERÊNCIAS

- ABDEL-HAMID, M.; OTTE, J.; DE GOBBA, C.; OSMAN, A.; HAMAD, E. Angiotensin Converting enzyme inhibitory activity and antioxidant capacity of bioactive peptides derived from enzymatic hydrolysis of buffalo milk proteins. *International Dairy Journal*, v. 66, p. 91-98, 2017.
- AHMED N, Petersson A, Catrina AI, et al. Tumor necrosis factor mediates temporomandibular joint bone tissue resorption in rheumatoid arthritis. *Acta Odontol Scand*. 2015;73(3):232–240.
- AKUTSU M , Ogura N, Ito K, Kawashima M, Kishida T, Kondoh T. Effects of interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α on macrophage inflammatory protein-3 α production in synovial fibroblast-like cells from human temporomandibular joints. *J Oral Pathol Med*. 2013 Jul;42(6):491-8. doi: 10.1111/jop.12040. Epub 2013 Jan 18.
- ALCARAZ, M.J.; FERNANDEZ, P.; GUILLEN, M.I. Anti-inflammatory actions of the heme oxygenase-1 pathway. *Curr Pharm Desig* (9): 2541–2551, 2003.
- ALSTERGREN P, Benavente C, Kopp S. Interleukin-1 β , interleukin-1 receptor antagonist, and interleukin-1 soluble receptor II in temporomandibular joint synovial fluid from patients with chronic polyarthritides. *J Oral Maxillofac Surg*. 2003;61:1171–1178.
- ARAÚJO I.W.F et al. Role of central opioid on the antinociceptive effect of sulfated polysaccharide from the red seaweed *Solieria filiformis* in induced temporomandibular joint pain. *Int Immunopharmacol* 44:160-167. Doi: 10.1016/j.intimp.2017.01.005. 2017.
- AGGARWAL, V.R., Macfarlane G.J., Farragher T.M., Mcbeth J Risk factors for Onset of chronic orofacial pain results of the North Cheshire oro-facial pain Prospective population study. *Pain* 149:354–359, 2010.
- 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.
- BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. 2001 Nature Publishing Group <http://immunol.nature.com>.
- BOGDAN, C. The function of nitric oxide in the immune system. in *Handbook of Experimental Pharmacology*. Volume: Nitric Oxide (ed. Mayer, B.) 443–492 (Springer, Heidelberg, 2000).
- BOMFIM, M. A. D.; QUEIROGA, R. C. E.; AGUILA, M. B.; MEDEIROS, M. C.; FISBERG, M.; RODRIGUES, M. T.; SANTOS, M. O.; LANNA, D. P. D. Abordagem multidisciplinar de P, D & I para o desenvolvimento de produto lácteo caprino com alto teor de CLA e alegação de propriedade funcional.

Revista Brasileira de Zootecnia / Brazilian Journal of Animal Science, v. 40, p. 98-106, 2011.

BRANDTZAEG P, Osnes L, Ovstebø R, Joø GB, Westvik AB, Kierulf P (1996). Net inflammatory capacity of human septic shock plasma evaluated by a monocyte-based target cell assay: identification of interleukin10 as a major functional deactivator of human monocytes. *J. Exp. Med.*, 184: 51-60.

BEZERRA M.M, S. D. Brain, S. Greenacre et al., "Reactive nitrogen species scavenging, rather than nitric oxide inhibition, protects from articular cartilage damage in rat zymosaninduced arthritis," *British Journal of Pharmacology*, vol. 141, no. 1, pp. 172–182, 2004.

CAIRNS, B.E et al. JOR-CORE recommendations on rehabilitation of temporomandibular disorders. *Journal of oral rehabilitation*, v. 37, n. 6, p. 481–9, 11 maio 2010.

CAIRNS, B.E. Pathophysiology of TMD pain - basic mechanisms and their implications for pharmacotherapy. *Journal of Oral Rehabilitation* 2010 37; 391–410. 2010.

CARLSON, C.R., Reid K.I., Curran S.L., et al. Psychological and physiological parameters of masticatory muscle pain. *Pain* 1998;76(3):297–307.

CHAVES, HV (2018) Heme oxygenase-1/biliverdin/carbon monoxide pathway downregulates hypernociception in rats by a mechanism dependent on cGMP/ATP-sensitive K⁺ channels. *Inflammation Research* <https://doi.org/10.1007/s00011-018-1133-Z>.

CONTI, P.C., Pinto-Fiamengui L.M., Cunha C.O., Conti A.C. Orofacial pain and temporomandibular disorders: the impact on oral health and quality of life. *Braz Oral Res.* 2012;26 (Suppl 1):120–123.

COURA, C.O. et al. Mechanisms involved in antinociception induced by a polysulfated fraction from seaweed *Gracilaria cornea* in the temporomandibular joint of rats. *Int J of Biol Macromol* 97:76-84. Doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.01.017. 2017.

CUNHA, F. Q., Lorenzetti, B. B., Poole, S. & Ferreira, S. H. (1991). Interleukin-8 as a mediator of sympathetic pain. *Br. J. Pharmacol.* 104, 765–767.

CUNHA, F. Q., Poole, S., Lorenzetti, B. B. & Ferreira, S. H. (1992). The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. *Br. J. Pharmacol.* 107, 660–664.

CURRAN, S.L., Carlson C.R., Okeson J.P. Emotional and physiologic responses to laboratory challenges: patients with temporomandibular disorders versus matched control subjects. *J Orofac Pain* 1996;10(2):141–50.

CURY, Y, Picolo G, Gutierrez VP, Ferreira SH (2011) Pain and analgesia: The dual effect of nitric oxide in the nociceptive system. *Nitric Oxide* 25:243–254. Doi:10.1016/j.niox.2011.06.004.

DE ROSSI, S. S. Orofacial pain: A primer. *Dental Clinics of North America*, v. 57, n. 3, p. 383–392, 2013.

DE ROSSI, S.S., Greenberg, M.S., Liu, F., Steinkeler, A., 2014. Temporomandibular disorders: Evaluation and management. *Med. Clin. North Am.* 98, 1353–1384. doi:10.1016/j.mcna.2014.08.009.

DO VAL, D.R et al. *Tephrosia toxicaria* Pers. reduces temporomandibular joint inflammatory hypernociception: The involvement of the HO-1 pathway. *Eur. J. Pain (United Kingdom)* 18, 1280–1289. doi:10.1002/j.1532-2149.2014.488.x. 2014.

DRIESSLER F, Venstrom K, Sabat R, Asadullah K, Schottelius AJ (2004) Molecular mechanisms of interleukin- 10- mediated inhibition of NF- κ B activity: a role for p50. *Clin Exp Immunol* 135: 64-73. Doi: 10.1111/j.1365-2249.2004.02342.x.

EL-SALAM, M. H. Application of proteomics to the areas of milk production, processing and quality control—A review. *International Journal of Dairy Technology*, v. 67, n. 2, p. 153166, 2014.

ERIKSEN, E. K.; VEGARUD, G. E.; LANGSRUD, T.; ALMAAS, H.; LEA, T. Effect of milk proteins and their hydrolysates on in vitro immune responses. *Small Ruminant Research*, v. 79, n. 1, p. 29-37, 2008.

ERNBERG M The role of molecular pain biomarkers in temporomandibular joint internal derangement. *J Oral Rehabil.* 2017 Jun;44(6):481-491. doi: 10.1111/joor.12480. Epub 2017 Jan 30.

ESMAEILPOUR, M; REZA EHSANI, M; AMINLARI, M; SHEKARFOROUSH, S; HOSEINI, E. Antimicrobial activity of peptides derived from enzymatic hydrolysis of goat milk caseins. *Comparative Clinical Pathology*, v. 25, p. 599-615, 2016.

FREITAS, R.S. et al (2016) Lectin from *Abelmoschus esculentus* reduces zymosan-induced temporomandibular joint inflammatory hypernociception in rats via heme oxygenase-1 pathway integrity and $\text{tnf-}\alpha$ and $\text{il-1}\beta$ suppression. *Int Immunopharmacol* 38:313-323. Doi: 10.1016/j.intimp.2016.06.012.

FERREIRA, L.A et al. Diagnosis of temporomandibular joint disorders: Indication of imaging exams. *Braz. J. Otorhinolaryngol.* 82, 341–352. doi:10.1016/j.bjorl.2015.06.010.

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

FERREIRA, S. H., Lorenzetti, B. B. & Poole, S. (1993). Bradykinin initiates cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia. *Br. J. Pharmacol.* 110, 1227–1231.

FREESMEYER, W.B., Fussnegger, M.R., Ahlers, M.O. (2005) Diagnostic and therapeutic-restorative procedures for masticatory dysfunctions. *GMS CurrTop Otorhinolaryngol Head Neck Surg* 4:1–29.

FREITAS, R.S et al. Lectin from *Abelmoschus esculentus* reduces zymosan-induced temporomandibular joint inflammatory hypernociception in rats via heme oxygenase-1 pathway integrity and tnf- α and il-1 β suppression. *Int Immunopharmacol* 38:313-323. Doi: 10.1016/j.intimp.2016.06.012. 2016.

GAUER, R.L., Semidey, M.J. Diagnosis and treatment of temporomandibular disorders. *Am Fam Physician.* 2015;91(6):378–386.

GIANNAKOPOULOS, N.N., Keller L., Rammelsberg, P., Kronmüller, K.T., Schmitter, M. Anxiety and depression in patients with chronic temporomandibular pain and in controls. *J Dent.* 2010;38(5):369–376.

GIL-MARTÍNEZ, A., Grande-Alonso M., La Touche R., Lara-Lara M., López-López A., Fernández-Carnero J. Psychosocial and somatosensory factors in women with chronic migraine and painful temporomandibular disorders. *Pain Res Manag.* 3945673, 2016.

GIL-MARTÍNEZ, A., Paris-Aleman A., López-de-Uralde-Villanueva I., La Touche, R. Management of pain in patients with temporomandibular disorder (TMD): Challenges and solutions. *Journal of Pain Research* 2018:11 571–587.

GOLDRING MB. Osteoarthritis and cartilage: the role of cytokines. *Curr Rheumatol Rep.* 2000;2:459–465.

GREENE, C. S. Managing the Care of Patients With Temporomandibular Disorders. *The Journal of the American Dental Association*, v. 141, n. 9, p. 1086–1088, 2010.

HAYLEY, A. Cole, M.A.S, Carlson, C.R. Mind-Body Considerations in Orofacial Pain. *Dent Clin N Am* 62 (2018) 683–694. 0011-8532/18/^a 2018 Elsevier Inc.

HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; GARCÍA-NEBOT, M. J.; FERNÁNDEZ-TOMÉ, S.; AMIGO, L.; RECIO, I. Dairy protein hydrolysates: Peptides for health benefits. *International Dairy Journal*, v. 38, n. 2, p. 82-100, 2014.

HERNÁNDEZ-PACHECO et al, 2008. Possible participation of the nitric oxide-cyclic GMP-protein kinase G-K⁺ channels pathway in the peripheral antinociception of melatonin. *Eur J Pharmacol.* 2008 Oct 31;596(1-3):70-6. doi: 10.1016/j.ejphar.2008.07.068. Epub 2008 Aug 13

HUI AY, McCarty WJ, Masuda K, Firestein GS, Sah RL. A systems biology approach to synovial joint lubrication in health, injury, and disease. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 2012;4:15–37.

IBI, M. Inflammation and Temporomandibular Joint Derangement. *Biol. Pharm. Bull.* 42, 538–542 (2019).

HAMADA Y, Kondoh T, Holmlund AB, et al. Inflammatory cytokines correlated with clinical outcome of temporomandibular joint irrigation in patients with chronic closed lock. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006;102:596–601.

KACENA MA, Merrel GA, Konda SR, Wilson KM, Xi Y, Horowitz MC. Inflammation and bony changes at the temporomandibular joint. *Cells Tissues Organs.* 2001;169(3):257-64.

KHALDI, N.; HOLTON, T. A.; SHIELDS, D. C. Amino acid enrichment and compositional changes among mammalian milk proteins and the resulting nutritional consequences. *Journal of Dairy Science.* n. 97, p. 1248–1258, 201

KHASAR S.G et al. A novel nociceptor signaling pathway revealed in protein kinase C epsilon mutant mice. *Neuron.* 1999 Sep;24(1):253-60.

KELLIESARIAN, S., Al-kheraif, A.A., Vohra, F., Ghanem, A., Malmstrom, H., Romanos, G.E., Javed, F., 2016. Cytokine profile in the synovial fluid of patients with temporomandibular joint disorders: A systematic review. *Cytokine* 77, 98–106. doi:10.1016/j.cyto.2015.11.00.

KIM YK, Kim SG, Kim BS, et al. Analysis of the cytokine profiles of the synovial fluid in a normal temporomandibular joint: preliminary study. *J Craniomaxillofac Surg.* 2012;40:337–341.

ZIMECKI, M, KRUZE, M. Milk-derived proteins and peptides of potential therapeutic and nutritive value. *Journal of Experimental Therapeutics and Oncology*, Vol. 6, pp. 89-106. 2006.

KORSZUN, A., Hinderstein, B., Wong, M. Comorbidity of depression with chronic facial pain and temporomandibular disorders. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1996;82(5):496–500.

KRISTENSEN KD, Alstergren P, Stoustrup P, et al. Cytokines in healthy temporomandibular joint synovial fluid. *J Oral Rehabil.* 2014;41:250–256.

KOSTRZEWA-JANICKA J., Jurkowski, P., Nędzi-góra, M., 2012. Inflammatory markers in temporomandibular joint disorders 37, 290–293. doi:10.5114/ceji.2012.30809

KUBOTA E, Kubota T, Matsumoto J, et al. Synovial fluid cytokines and proteinases as markers of temporomandibular joint disease. *J Oral Maxillofac Surg.* 1998;56:192–198.

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* 1993;124:115–21.

LORENZETTI, B. B., Veiga, F. H., Canetti, C. A., Poole, S., Cunha, F. Q. & Ferreira, S. H. (2002). Cytokine-induced neutrophil chemoattractant 1 (CINC-1) mediates the sympathetic component of inflammatory mechanical hypersensitivity in rats. *Eur. Cytokine Network* 13, 456–461.

MACIEL, M.A.M, Pinto, A.C, Junior, V.F.V. Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. *Quím. Nova* vol.25 no.3 São Paulo. 2001.

MACMICKING, J., Xie, Q.-W. & Nathan, C. Nitric oxide and macrophage function. *Ann. Rev. Immunol.* 15, 323–350 (1997).

MANFREDINI, D. 2011. Research diagnostic criteria for temporomandibular disorders: a systematic review of axis I epidemiologic findings. *YMOE* 112, 453–462. doi:10.1016/j.tripleo.2011.04.021.

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

MCCREARY, C.P., Clark, G.T., Merrill R.L., et al. Psychological distress and diagnostic subgroups of temporomandibular disorder patients. *Pain* 1991;44(1): 29–34.

MCNEILL C; Norman D. Mohl; John D. Rugh; Terry T. Tanaka. *JADA*, Vol. 120, March 1990 ■ 253.

MERSKEY, H.; Bogduk, N. Iasp taxonomy updated from Pain Terms, A Current List with Definitions and Notes on Usage" (pp 209-214) Classification of Chronic Pain, Second Edition, IASP Task Force on Taxonomy, 2012.

MOW VC, Holmes MH, Lai WM. Fluid transport and mechanical properties of articular cartilage: a review. *J Biomech.* 1984;17(5):377-94.

NAKAMURA, M. & Ferreira, S. H. (1987). A peripheral sympathetic component in inflammatory hyperalgesia. *Eur. J. Pharmacol.* 135, 145–153.

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

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

OPAL SM, Huber CE. The role of interleukin-10 in critical illness. *Curr Opin Infect Dis.* 2000 Jun;13(3):221-226.

OSIEWICZ, M.A., Lobbezoo, F., Loster, B.W., Jolanta, E., Manfredini, D., Osiewicz, M.A., Lobbezoo, F., Loster, B.W., Jolanta, E., 2017. Frequency of temporomandibular disorders diagnoses based on RDC / TMD in a Polish patient population. *CRANIO* 9634, 1–7. doi:10.1080/08869634.2017.1361052

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

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

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.

PATIL, P.; MANDAL, S.; TOMAR, S. K.; ANAND, S. Food protein-derived bioactive peptides in management of type 2 diabetes. *European Journal of Nutrition*, v. 54, p. 863880, 2015.

PEREIRA, P. C. Milk nutritional composition and its role in human health. *Nutrition*, 2013. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0899900713004607#>.

PETERS VA, Joesting JJ, Freund GG. IL-1 receptor 2 (IL1R2) and its role in immune regulation. *Brain Behav Immun.* 2013;32:1–8.

POOLE, S., Cunha, F. Q. & Ferreira, S. H. (1999) in *Cytokines and Pain*, eds. Watkins, L. R. & Maier, S. F. (Springer, Berlin), pp. 59–87.

REITER, S., Emodi-Perlman, A., Goldsmith, C., Friedman-Rubin, P., Winocur, E. Comorbidity between depression and anxiety in patients with temporomandibular disorders according to the research diagnostic criteria for temporomandibular disorders. *J Oral Facial Pain Headache.* 2015;29(2):135–143.

RIVANOR R.L.C et al. A lectin fraction from green seaweed *Caulerpa cupressoides* inhibits inflammatory nociception in the temporomandibular joint of rats dependent from peripheral mechanisms. *International Journal of Biological Macromolecules.* 115 (2018) 331–340. 2018.

RODRIGUES, A.R.A., Duarte, I.D.G., 2000. The peripheral antinociceptive effect induced by morphine is associated with ATP-sensitive K⁺ channels. *British Journal of Pharmacology* 129, 110–114.

SARAIVA M, O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol*. 2010 Mar;10(3):170-81. doi: 10.1038/nri2711. Epub 2010 Feb 15.

SESSLE, B.J. Peripheral and central mechanisms of orofacial pain and their clinical correlates. *Minerva Anesthesiol*. 2005 Apr;71(4):117-36.

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

SORENSEN, A., Hresko, K., Butcher, S., Pierce, S., Leonardi, R., Loreto, C., Bosio, J., Eduardo, L., Sorenson, A., Hresko, K., Butcher, S., Pierce, S., Leonardi, R., Loreto, C., Bosio, J., Almeida, L.E., 2017. Expression of Interleukin-1 and temporomandibular disorder: Contemporary review of the literature. *CRANIO®* 9634, 1–5. doi:10.1080/08869634.2017.1342890

STEGENDA B, De Bont LG, Boering G. A proposed classification of temporomandibular disorders based on synovial joint pathology. *Cranio*. 1989 Apr;7(2):107-18.

SUVINEN, T.I., Reade, P.C., Kempainen, P., Könönen, M., Dworkin, S.F. Review of aetiological concepts of temporomandibular pain disorders: towards a biopsychosocial model for integration of physical disorder factors with psychological and psychosocial illness impact factors. *Eur J Pain*. 2005;9(6):613–633.

SLADE G.D et al. Painful Temporomandibular Disorder: Decade of Discovery from OPPERA Studies. *Journal of Dental Research* 2016, Vol. 95(10) 1084 – 1092.

SCHMID-SCHWAP, M., Bristela, M., Kundi, M., Piehslinger, E., 2013. Sex-specific differences in patients with temporomandibular disorders. *J. Orofac. Pain* 27, 42–50. doi:10.11607/jop.970.

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

VANDERLEI E.S.O. et al (2011) The involvement of the HO-1 pathway in the anti-inflammatory action of a sulfated polysaccharide isolated from the red seaweed *Gracilaria birdiae*. *Inflamm. Res*. DOI 10.1007/s00011-011-0376-8.

VERNAL R, Velasquez E, Gamonal J, et al. Expression of proinflammatory cytokines in osteoarthritis of the temporomandibular joint. *Arch Oral Biol*. 2008;53:910– 915.

VICENTE, A.M.; GUILLEN, M.I.; HABIB, A.; ALCARAZ, M.J. Beneficial effects of heme oxygenase-1 up-regulation in the development of experimental

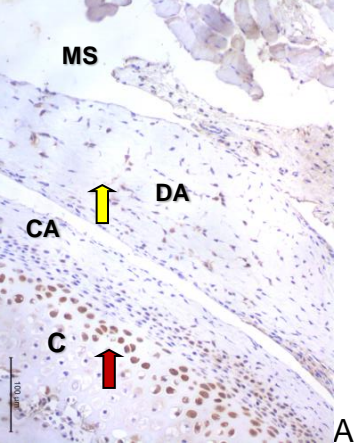
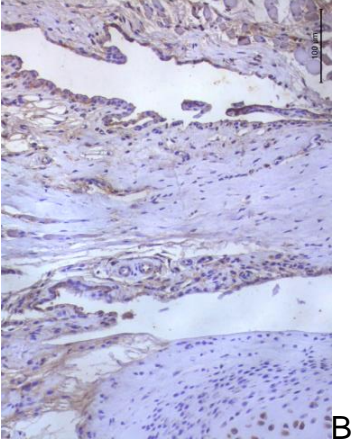
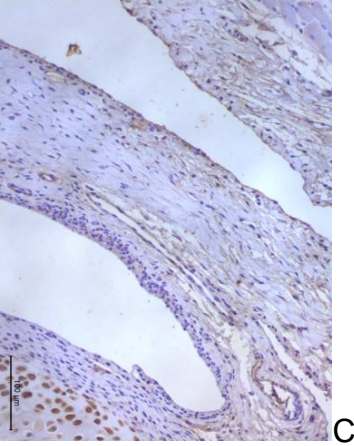
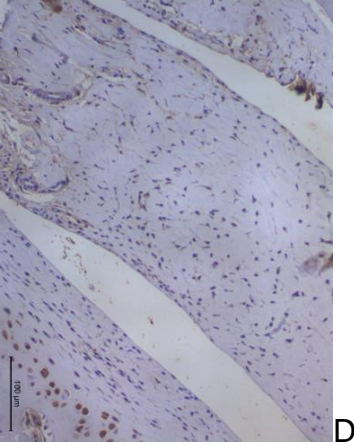
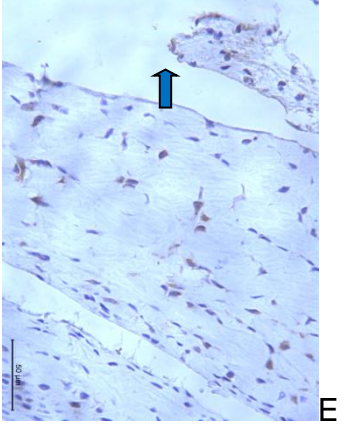
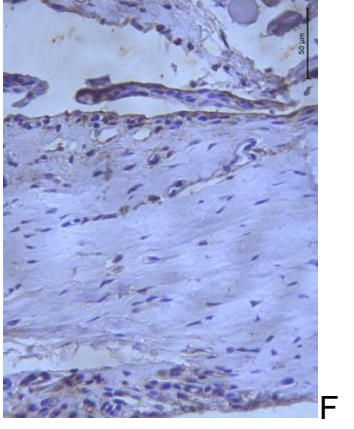
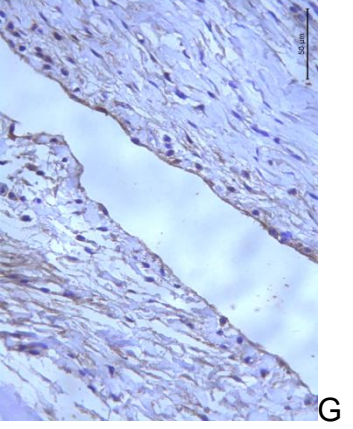
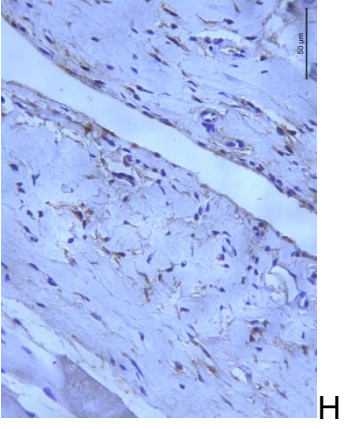
inflammation induced by zymosan. *J Pharmacol Exp Ther*, v. 307, p. 1030–1037, 2003.

VILCEK J, Lee T.H. Tumor necrosis factor: New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions. *J Biol Chem* 266:313.1991.

WAHL, S. M, N. McCartney-Francis, J. Chan, R. Dionne, L. Ta, and J. M. Orenstein, “Nitric oxide in experimental joint inflammation:benefit ordetriment?” *Cells Tissues Organs*, vol. 174, no. 1-2, pp. 26–33, 2003.

YAMAUCHI, R; OHINATA, K; YOSHIKAWA, M. Beta-lactotensin and neurotensin rapidly reduce serum cholesterol via NT2 receptor. *Peptides*, v. 24, n. 12, p. 1955-1961, 2003.

ZAKRZEWSKA, J. M. Multi-dimensionality of chronic pain of the oral cavity and face. *The journal of headache and pain*, v. 14, p. 37, 2013.

	Saline	Formalin	HDP	HDT
TMJ	 <p>MS CA DA C 50 μm</p>	 <p>50 μm</p>	 <p>50 μm</p>	 <p>50 μm</p>
SM	 <p>50 μm</p>	 <p>50 μm</p>	 <p>50 μm</p>	 <p>50 μm</p>

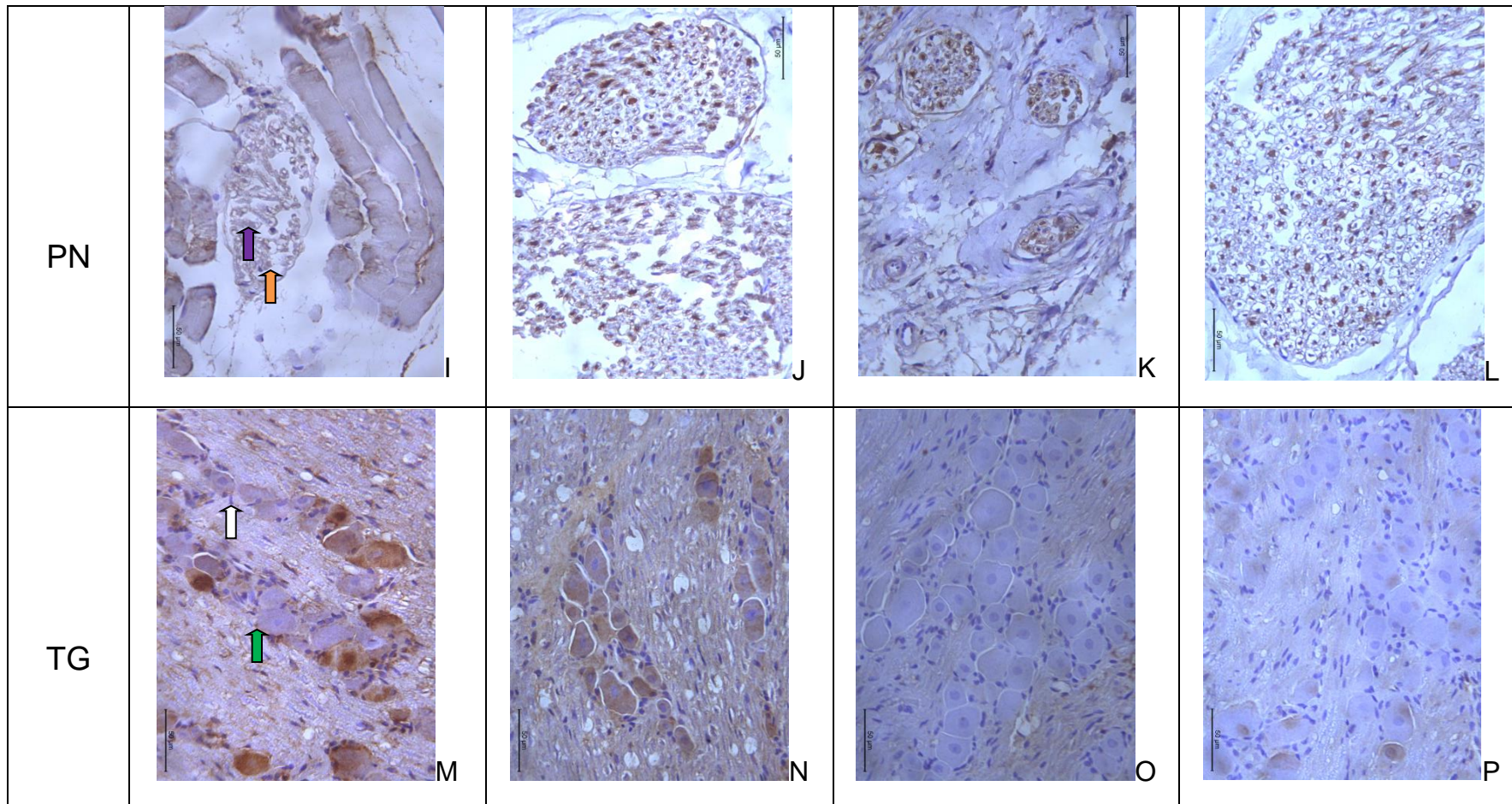
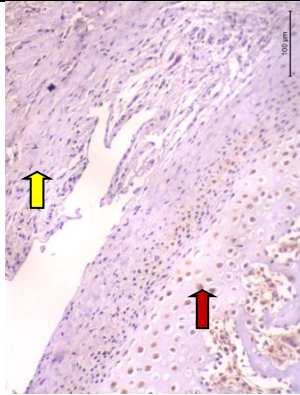
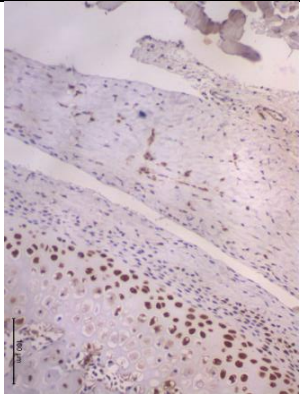
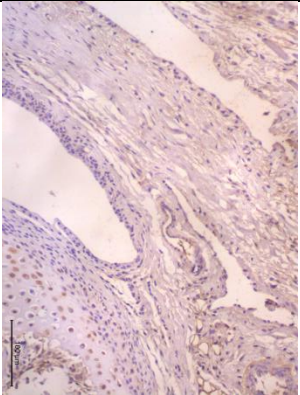
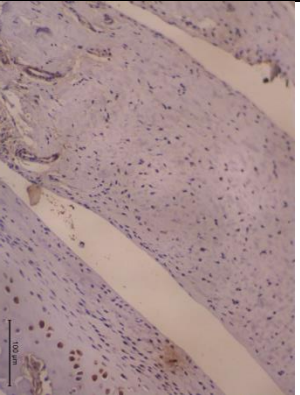
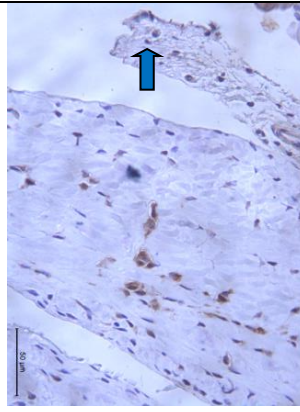
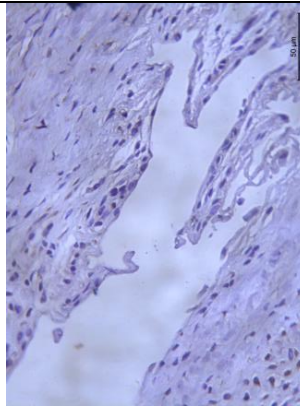
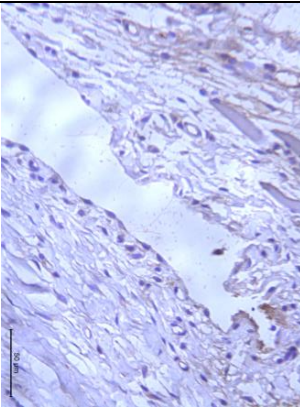
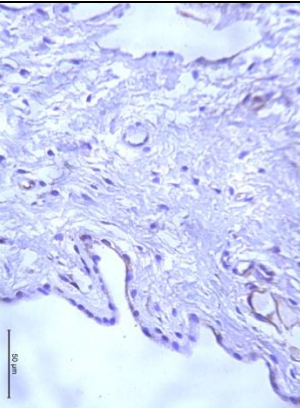


Fig 6. Immunostaining photomicrographs for TNF α (A, B, C, D): photomicrographs of the TMJ (200 x); (E, F, G, H): photomicrographs of the TMJ showing the synovial membrane (400 x); (I, J, K, L): photomicrographs of the TMJ showing a peripheral nerve branch (400 x); (M, N, O, P): photomicrographs of the trigeminal ganglion (400 x). C: condyle; AC: articular cartilage; AD: articular disc; SM: synovial membrane. Red arrow: chondrocyte; yellow arrow: fibroblast; blue arrow: synoviocyte; orange arrow: perineurium; purple arrow: axon; green arrow: neuronal cell body; white arrow: glial satellite cells.

	Saline	Formalin	HDP	HDT
TMJ	 <p>A</p>	 <p>B</p>	 <p>C</p>	 <p>D</p>
SM	 <p>E</p>	 <p>F</p>	 <p>G</p>	 <p>H</p>

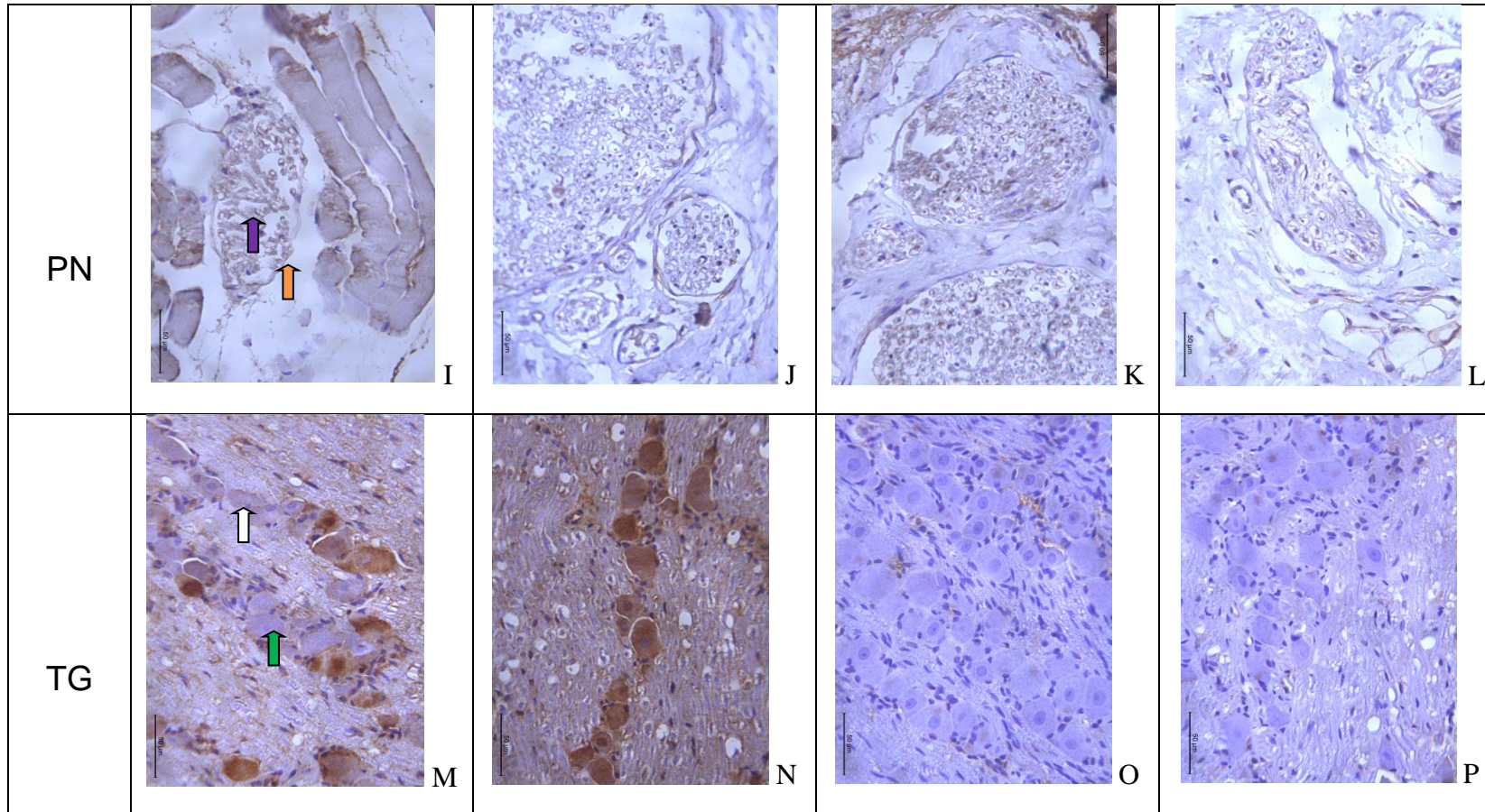
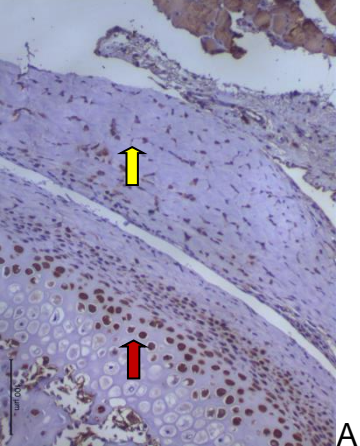
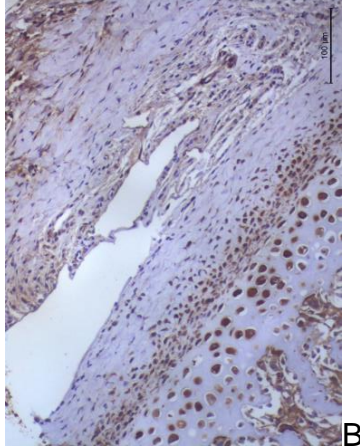
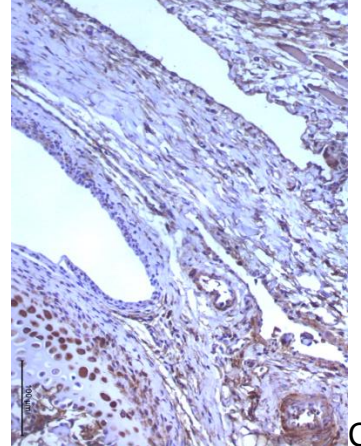
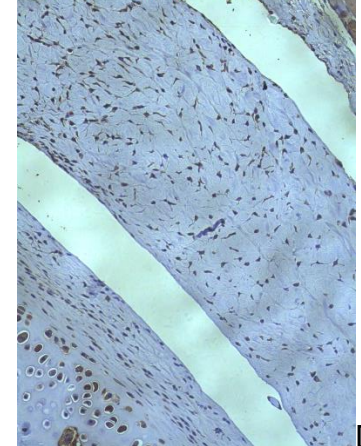
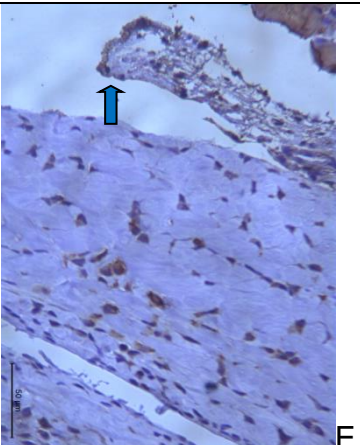
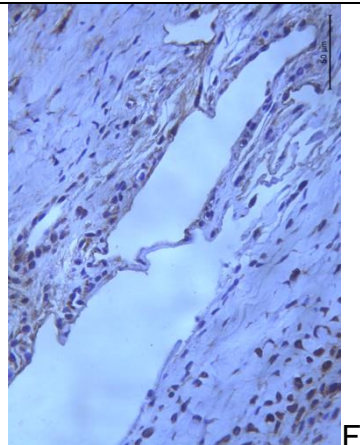
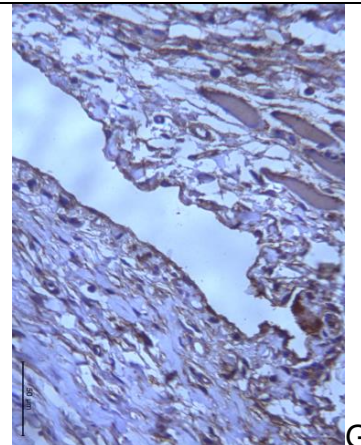
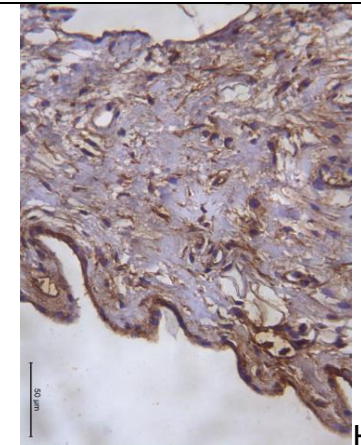


Fig 7. Immunostaining photomicrographs for IL-1 β (A, B, C, D): photomicrographs of the TMJ (200 x); (E, F, G, H): photomicrographs of the TMJ showing the synovial membrane (400 x); (I, J, K, L): photomicrographs of the TMJ showing a peripheral nerve branch (400 x); (M, N, O, P): photomicrographs of the trigeminal ganglion (400 x). C: condyle; AC: articular cartilage; AD: articular disc; SM: synovial membrane. Red arrow: chondrocyte; yellow arrow: fibroblast; blue arrow: synoviocyte; orange arrow: perineurium; purple arrow: axon; green arrow: neuronal cell body; white arrow: glial satellite cells.

	Saline	Formalin	HDP	HDT
TMJ	 <p>A</p>	 <p>B</p>	 <p>C</p>	 <p>D</p>
SM	 <p>E</p>	 <p>F</p>	 <p>G</p>	 <p>H</p>

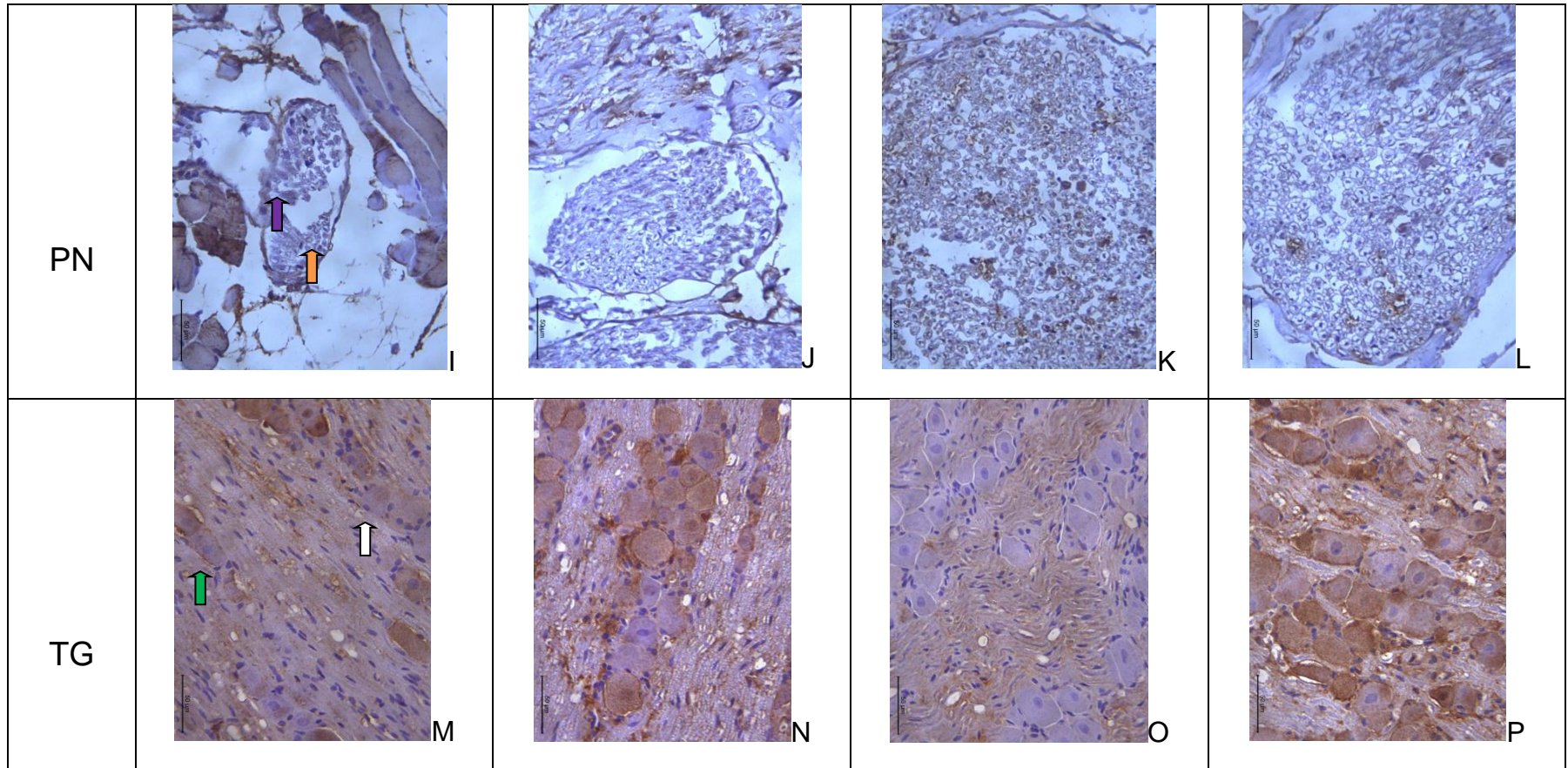


Fig 8. Immunostaining photomicrographs for IL-10 (A, B, C, D): photomicrographs of the TMJ (200 x); (E, F, G, H): photomicrographs of the TMJ showing the synovial membrane (400 x); (I, J, K, L): photomicrographs of the TMJ showing a peripheral nerve branch (400 x); (M, N, O, P): photomicrographs of the trigeminal ganglion (400 x). C: condyle; AC: articular cartilage; AD: articular disc; SM: synovial membrane. Red arrow: chondrocyte; yellow arrow: fibroblast; blue arrow: synoviocyte; orange arrow: perineurium; purple arrow: axon; green arrow: neuronal cell body; white arrow: glial satellite cells.

ANEXO A: Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)



Universidade Federal do Ceará – *Campus Sobral*
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA
Rua: Av. Comte. Maurocélvio Rocha Pontes, 100, Derby
CEP: 62.042-280 Sobral-CE
Fone/Fax: (88) 3611.8000

CERTIFICADO

Certificamos que o adendo solicitando prorrogação por mais dois anos, da proposta intitulada: **“Avaliação do potencial antinociceptivo e anti-inflamatório de caseínas do leite, de peptídeo hidrolisado de uma caseína do leite e de frações do soro de *Capra hircus* em ensaio pré-clínico de hipernocicepção na ATM de ratos”**, registrada com o nº 05/17, sob a responsabilidade do **Profa. Dra. Heliada Vasconcelos Chaves** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) *Campus Sobral*, em reunião de 10/09/2019.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Prazo inicial: 20/07/2017 até 20/07/2019 Prorrogação: 20/07/2019 até 20/07/21
Espécie/linhagem/raça	Ratos heterogênico Wistar
Nº de animais	336
Peso/Idade	180-220g/2-4 meses
Sexo	♂ Machos
Origem	Biotério Central de Fortaleza

Sobral, 23 de setembro de 2019.

Profa. Dra. Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA