



UNIUBE

Educação e Responsabilidade Social

UNIVERSIDADE DE UBERABA

MARIANA DA SILVA QUINTEIRO

FISIOTERAPEUTA

Avaliação do efeito periférico da 15d-PGJ₂ na artrite reumatoide induzida experimentalmente na articulação temporomandibular de ratos

UBERABA – MG

2011

MARIANA DA SILVA QUINTEIRO
FISIOTERAPEUTA

Avaliação do efeito periférico da 15d-PGJ₂ na artrite reumatoide induzida experimentalmente na articulação temporomandibular de ratos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade de Uberaba como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de concentração Biopatologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Juliana Trindade Clemente Napimoga

Coorientador: Prof. Dr. Marcelo Henrique Napimoga

UBERABA – MG

2011

Quinteiro, Mariana da Silva.
Q42a Avaliação do efeito periférico de 15d-PGJ₂ na artrite reumatoide induzida experimentalmente na articulação temporomandibular de ratos / Mariana da Silva Quinteiro. 2011.

61 f.

Dissertação (mestrado) -- Universidade de Uberaba. Programa de Mestrado em Odontologia, área de concentração em Biopatologia.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Juliana Trindade Clemente Napimoga.

Coorientador: Prof^º. Dr^º. Marcelo Henrique Napimoga.

1. Artrite reumatoide. 2. Articulação temporomandibular. I. Universidade de Uberaba. Programa de Mestrado em Odontologia. II. Napimoga, Juliana Trindade Clemente. III. Napimoga, Marcelo Henrique. IV. Título

CDD: 616.722 7

Ata da Sessão Pública de defesa de dissertação para obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de concentração em Biopatologia, a que se submeteu a aluna Mariana da Silva Quinteiro – matrícula 5007552, orientada pela Profa. Dra. Juliana Trindade Clemente Napimoga Napimoga

Aos quatro dias do mês de fevereiro do ano de dois mil e onze, às 17 horas, no anfiteatro da biblioteca da Universidade de Uberaba, reuniu-se a Comissão Julgadora da defesa em epígrafe indicada pelo o Colegiado do Programa de Mestrado em Odontologia da Universidade de Uberaba, composta pelos Professores Doutores: Juliana Trindade Clemente Napimoga - **Presidente**, Edvaldo Antônio Ribeiro Rosa e Ruchele Nogueira Dias Geraldo Martins, para julgar o trabalho da candidata Mariana da Silva Quinteiro, apresentado sob o título: "**Avaliação do Efeito Periférico da 15d-PGJ2 na Artrite Reumatóide Induzida Experimentalmente na Articulação Temporomandibular de Ratos**". A Presidente declarou abertos os trabalhos e agradeceu a presença de todos os Membros da Comissão Julgadora. A seguir o candidato dissertou sobre o seu trabalho e foi argüido pela Comissão Julgadora, tendo a todos respondido às respectivas argüições. Terminada a exposição, a Comissão reuniu-se e deliberou pelo seguinte resultado:

APROVADO

REPROVADO (anexar parecer circunstanciado elaborado pela Comissão Julgadora)

Para fazer jus ao título de MESTRE EM ODONTOLOGIA ÁREA DE CONCENTRAÇÃO BIOPATOLOGIA, a versão final da tese, considerada Aprovada devidamente conferida pela Secretaria de Mestrado em Odontologia, deverá ser entregue à Secretaria dentro do prazo de 30 dias, a partir da data da defesa. O aluno Aprovado que não atender a esse prazo será considerado Reprovado. Após a entrega do exemplar definitivo, o resultado será homologado pela Universidade de Uberaba, conferindo título de validade nacional aos aprovados. Nada mais havendo a tratar, O Senhor Presidente declara a sessão encerrada, cujos trabalhos são objeto desta ata, lavrada por mim, que segue assinada pelos Senhores Membros da Comissão Julgadora, pelo Coordenador do Programa de Mestrado em Odontologia da UNIUBE, com ciência do aluno. Uberaba, aos 4 dias do mês de fevereiro de dois mil e onze.

Prof. Dr. Juliana Trindade Clemente Napimoga _____

Prof. Dr. Edvaldo Antônio Ribeiro Rosa _____

Profª. Drª. Ruchele Nogueira Dias Geraldo Martins _____

Prof. Dr. José Bento Alves _____
Coordenador do Programa de Mestrado em Odontologia da UNIUBE

Poliana Gomes da Silva Alves _____
Secretária do Programa de Mestrado em Odontologia da UNIUBE

Ciência do Aluno: _____

*Dedico este trabalho ao meu amado pai, **Deusdete**, por estar sempre ao meu lado e me incentivar a levantar nas quedas e a continuar caminhando e por sempre me dar asas, mesmo que eu não me sinta capaz de voar.*

Agradecimentos Especiais

À **Profa. Dra. Juliana Trindade Clemente Napimoga**, pela orientação, pela oportunidade de trabalhar sob seus cuidados e pelo incentivo através do seu exemplo de determinação dentro de seus objetivos, que muito contribuiu para a minha formação como mestre.

Ao **Prof. Dr. Marcelo Henrique Napimoga**, pela coorientação e por sua presença e ajuda constante no laboratório de pesquisa, pelas palavras certas nos momentos de indecisão, pelas muitas dúvidas esclarecidas e pelo seu precioso tempo.

Ao **Prof. Dr. Rudolph Von Müller** e sua **toda** sua equipe: **Dr. Erasmo, Dra. Carmen, Dr. Gustavo, Dr. Fernandez, Dr. Daniel, Dr. Levi, Hélivio, Indiano, Domingas e tantos outros que compõe essa família cujos nomes eu não seria humanamente capaz de nomear agora**, pelo apoio diário, nos momentos bons e ruins, auxiliando minha caminhada na execução deste trabalho e em toda a minha vida.

Essencialmente, à **Deus...**

"Vinde a mim, todos os que andais em sofrimento e vos achais sobrecarregados, e Eu vos aliviarei. Tomai sobre vós o meu jugo, e aprendei de mim, que sou manso e humilde de coração, e achareis descanso para as vossas almas. Porque meu jugo é suave e o meu fardo é leve".

Mateus XI – 28 a 30

Agradecimentos

Aos meus pais, **Magnólia** e **Deusdete**, e ao meu irmão, **Gustavo**, pelo amor e apoio incondicionais.

À **família Silva**, por suas histórias únicas. Em especial ao meu primo **Léo**, por sua presença constante.

À **família Quinteiro**, por suas muitas histórias de lutas, determinação e vitórias. Em especial a minha amada tia **Lene**, um dos meus maiores exemplos, e a minha caçulinha, **Selly**, por sua coragem em voar alto, meu grande orgulho.

A **todos os docentes** do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade de Uberaba pela preciosa contribuição em minha formação científica. Em especial ao **Prof. Dr. Marcelo Fernandes** por sua didática, profissionalismo e disposição em ajudar. Obrigada por me fazer não ter medo de pipetas e diluições.

Aos **Professores Doutores Edvaldo Antônio Ribeiro Rosa, Geraldo Thedei Junior, Sanívia Aparecida de Lima Pereira, Ruchele Dias Nogueira** que aceitaram participar das bancas de qualificação e defesa desta dissertação, contribuindo imensamente com suas sugestões, palavras de incentivo, dedicando a este trabalho uma parcela de seu tempo precioso.

À **família Martins da Costa**, por me adotarem, especialmente aos “avós” **Otacílio** e **Adair**, às “tias” **Marisa** e **Patrícia**, ao sempre querido **Rafael** e ao pequenino que nos inunda de luz, **Antônio**.

À **família Machado Borges Prata**, que me aceitaram em seu berço. À **Maria Neli**, pela amizade e por me ensinar como iniciar este trabalho. Ao eterno amigo-irmão **Marco Túlio**, pela amizade e carinho incondicionais, pelo apoio a qualquer hora, pelos espetinhos de picanha e, especialmente, por acreditar que é –

erroneamente, mas apreciavelmente – responsável pelos meus passos e escolhas na Senda da vida. Meu eterno agradecimento.

À **família Fisioclínica**, todos os funcionários e pacientes, por compreenderem a minha ausência da empresa nestes dois anos.

À melhor amiga, **Lilian Deamo**, e ao seu filho e meu afilhado, **Enzo Deamo**, por compreenderem os muitos dias em que estive ausente nestes dois anos.

Ao querido **Cristiano (Suti)**, pela amizade, planos mirabolantes durante os chopps e por me apresentar ao Office 2007, com tanta paciência.

À minha querida **Barbara Lucena** e a **família Lucena** por todos os inesquecíveis dias de Rio de Janeiro, as muitas histórias e risadas e pela *playlist* inspiradora para a execução deste trabalho.

À **Átina Gomes Silva**, pela amizade sincera e espiritualmente firmada.

À **Lilian Laterza** pela amizade diária.

Ao amigo **Gabriel Habib** pelas boas vibrações e pelas mudanças necessárias.

Aos **amigos do Centro Espírita Jesus de Nazaré**, por fazerem parte da minha vida há alguns anos e estarem ao meu lado com suas orações e votos de perseverança e otimismo.

Aos **amigos do Sanatório Espírita de Uberaba** e do **Amor Exigente** que oferecem apoio, carinho e suporte a tantos necessitados e nos faz evoluir como seres humanos ao compartilharmos as histórias e os sofrimentos de tantas vidas.

Ao **Luis Fernando** pelo cuidadoso manejo dos animais do biotério.

Aos alunos de Iniciação Científica, **Alexandre, Diego e Karen**, pela participação neste trabalho

Aos colegas de mestrado: **Danilo, Jordana, Luciana, Mariana Cassimiro, Renato e Wellington**, pelas trocas de experiências boas ou ruins que tanto contribuíram para o meu crescimento científico e como humana.

A **todas** as secretárias do Programa de Pós-Graduação da Universidade de Uberaba, em especial à **Graciela** e a **Poliana**, pela assessoria técnico-científica e conversas descontraídas.

A **todos** que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deles trabalho.

"E assim, rasgando joelhos e mãos, a gente afinal, vai"

Lya Luft em Perdas & Ganhos, 2003

"Segue o teu destino; Rega as tuas plantas; Ama as tuas rosas.

O resto é a sombra de árvores alheias."

Fernando Pessoa

RESUMO

A Artrite Reumatoide (AR) é uma doença inflamatória crônica de caráter autoimune que resulta na destruição da cartilagem e ossos. A Articulação temporomandibular (ATM) quando afetada pela AR pode produzir dor, rigidez articular, limitações de abertura e mordida aberta. Este estudo avaliou o efeito da administração periférica da 15d-PGJ₂ no comportamento nociceptivo induzido experimentalmente pela AR na ATM de ratos, bem como seus mecanismos. Ratos Wistar foram imunizados através de injeções subcutâneas de 500 mg de mBSA diluídos em 0,2 ml de emulsão contendo 0,1 ml de fosfato salina (PBS) e 0,1 ml de Adjuvante Completo de Freund. Injeções de mBSA dissolvido em Adjuvante Incompleto de Freund foram dadas 7 e 14 dias após a primeira imunização. Ratos não imunizados receberam injeções semelhantes, mas sem o antígeno (mBSA). Vinte e um dias após a injeção inicial, a Artrite foi induzida nos animais imunizados através de uma injeção intra-articular de mBSA (1, 3 ou 10 µg/ATM). Ratos não imunizados e imunizados foram desafiados com o mBSA ou com PBS (controle). Os animais foram sacrificados 6, 12, 24 ou 48 horas após a injeção intra-articular do mBSA seguida (15 min) pela injeção de uma dose sublimiar de formalina (0,5%) na ATM. Um conjunto diferente de animais imunizados foram desafiados com mBSA (seguido de injeção com 0,5% de formalina) e receberam diferentes doses de 15d-PGJ₂ (30, 100 ou 300 ng/ATM). A hipernocicepção foi avaliada medindo as respostas comportamentais nociceptivas, como coçar a região orofacial e levantar a cabeça. Depois dos experimentos comportamentais, os animais foram anestesiados e tecidos periarticulares foram retirados e homogeneizados. Os sobrenadantes foram utilizados para avaliar os níveis de TNF-α, IL-1β e KC por ELISA e também para avaliar a expressão de PKC e PKA por análise de Western Blot. Todos os procedimentos experimentais em animais e os protocolos foram aprovados pelo Comitê em Pesquisa Animal da Universidade de Uberaba (059/2009). A injeção intra-articular do mBSA, mas não PBS, induziu respostas comportamentais nociceptivas em ratos imunizados. O pico destas respostas foram obtidas utilizando 10 µg/ATM de mBSA após 24h. O pré-tratamento (15min) com 15d-PGJ₂ (30, 100 e 300 ng/ATM) inibiu a hipernocicepção induzida pela AR na ATM de uma maneira dose-dependente (47%, 51% e 65%

respectivamente, Tukey $p < 0,05$). Nenhuma das três doses utilizadas reduziu a expressão de TNF- α e IL-1 β , mas reduziram a quantidade de KC (72%, 74% e 57% respectivamente, $p < 0,05$). Análises através do Western Blot demonstrou que o uso de 100 ng/ATM da 15d-PGJ₂ na ATM com AR induzida foi capaz de reduzir a expressão de PKA (67%, $p < 0,05$), assim como a expressão de PKC (42%, $p < 0,05$). No presente estudo, demonstramos que a 15d-PGJ₂ foi capaz de reduzir o comportamento nociceptivo da AR induzida na ATM. Este efeito antinociceptivo está relacionado, em parte, devido à diminuição dos níveis de KC, da expressão da PKA e da PKC na ATM.

Palavras-chaves: Artrite Reumatoide. Articulação temporomandibular. Dor. 15d-PGJ₂

ABSTRACT

Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune chronic inflammatory disease that results in the destruction of cartilage and bone. Temporomandibular joints (TMJ) afflicted with RA may produce pain, joint stiffness, difficulties in opening the mouth, and open bite. This study evaluated the effect of peripheral administration of the 15d-PGJ₂ into the rat TMJ on nociceptive behavioral induced by Rheumatoid Arthritis as well its mechanisms. Wistar rats were immunized with 500 µg of mBSA in 0.2 ml of an emulsion containing 0.1 ml phosphate buffered saline (PBS) and 0.1 ml Freund's complete adjuvant administered by subcutaneous injection. Booster injections of mBSA dissolved in Freund's incomplete adjuvant were given 7 and 14 days after the first immunization. Nonimmunized rats received similar injections but without the antigen (mBSA). Twentyone days after the initial injection, arthritis was induced in the immunized animals by intraarticular injection of mBSA (1, 3, or 10 µg/TMJ). Nonimmunized and immunized rats were challenged with mBSA or with PBS. Animals were killed 6, 12, 24 or 48 hours after intraarticular injections of mBSA followed (15 min) by the injection of a low dose of formalin (0.5%) into the TMJ. A different set of immunized animals were challenged (mBSA followed by injection with 0.5% of formalin) and received different doses of 15d-PGJ₂ (30,100 or 300 ng/TMJ). The hyperalgesia was assessed by measuring the behavioral nociceptive responses, such as rubbing the orofacial region and flinching the head. After behavioral experiments, animals were terminally anesthetized and periarticular tissues were removed and homogenized. The supernatants were used to evaluate the levels of TNF-α, IL-1β and KC by ELISA as well the expression of PKC and PKA by Western Blot analysis. All animal experimental procedures and protocols were approved by the Committee on Animal Research of the University of Uberaba (059/2009). The intraarticular injection of mBSA, but not PBS, in immunized rat induced dose- and timedependent behavioral nociceptive responses in which the peak of behavioral nociceptive responses were obtained by using 10ug/TMJ of mBSA after 24h. Pretreatment (15min) with 15d-PGJ₂ (30, 100 and 300 ng/TMJ) inhibited the RA-induced TMJ hyperalgesia in a dose-dependent manner (47%, 51% and 65% respectively, Tukey p<0.05). None of the three doses used reduced the expression of TNF-α and IL-1β, but reduced the amount of KC (72%, 74% and 57% respectively,

p<0.05). The Western Blot analysis demonstrated that using 100 ng/TMJ of 15d-PGJ₂ in RA-induced TMJ was able to reduce the expression of PKA (67%, p<0.05) as well the expression of PKC (42%, p<0.05). In the present study, we demonstrated that 15d-PGJ₂ was able to reduce the RA-induced TMJ nociceptive behavior. This antinociceptive effect is related, in part, due to decrease of KC levels and PKA/PKC expression in the TMJ.

Keywords: Rheumatoid Arthritis. Temporomandibular joint. Pain. 15d-PGJ₂

LISTRA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Dispositivo para aplicação de drogas na ATM	33
Figura 2: Caixa de observação utilizada para a realização das análises comportamentais	34
Figura 3: Injeção na ATM direita do animal anestesiado	34
Figura 4: Tabela utilizada para quantificar o Teste comportamental	35
Figura 5: A Artrite Reumatoide induz nocicepção na ATM	41
Figura 6: 15d-PGJ ₂ inibe a resposta nociceptiva induzida pela Artrite Reumatoide na ATM.	42
Figura 7: 15d-PGJ ₂ reduz os níveis de KC mas não de TNF- α e IL-1 β na ATM com Artrite Reumatoide induzida	44
Figura 8: 15d-PGJ ₂ inibe a expressão de PKA e PKC na AR induzida na ATM	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Micrograma
µl	Microlitros
15d-PGJ₂	15-desoxi-Δ12,14 prostaglandina J2
AA	Ácido Araquidônico
AIA	Artrite induzida por antígeno
AMPc	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
ANOVA	Análise de variância
AP-1	Proteína ativadora-1
AR	Artrite Reumatoide
ATM	Articulação Temporomandibular
BSA	Albumina bovina sérica
Ca⁺²	Cálcio
CFA	Adjuvante Completo de Freund
COX	Ciclooxigenase
CXCL1/KC	Quimiocina derivada de queratinócito
CXCL5	CXC quimiocinas fator 5
CXCL8/ II-8	Interleucina-8
DCV	Doenças cardiovasculares
DTMs	Distúrbios temporomandibulares
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético

ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ERK	Extracellular-signal-regulated kinases
g	Gramma
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
h	Hora
IASP	Associação Internacional para Estudo da Dor
IFA	Adjuvante Incompleto de Freund
IL-1	Interleucina 1
IL-15	Interleucina 15
IL-18	Interleucina 18
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
iNOS	Calcium-insensitive Nitric oxide synthases
Kg	Kilo
mBSA	Proteína albumina bovina sérica metilada
MMP-9	Matrix metallopeptidase 9
MCP-1	Monocyte chemotactic protein -1
min	Minutos
Na⁺	Sódio
NaCl	Cloreto de Sódio
NF-κB	Fator nuclear- κ B
ng	Nanograma

NGF	Fator de crescimento neural
PBS	Tampão Fosfato Salina
PG	Prostaglandina
PGD₂	Prostaglandina D ₂
PGE₂	Prostaglandian E ₂
PGF_{2α}	Prostaglandina F _{2α}
PGI₂	Prostaciclina
PKA	Proteoquinase A
PKC	Proteoquinase C
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
PPAR-γ	Peroxisome proliferator-activated receptor gama
PPAR-α	Peroxisome proliferator-activated receptor alfa
PPAR-β/δ	Peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta
RPM	Rotações por minuto
s.c.	Sub cutânea
TNF-α	Tumor necrosis factor-alpha
TRPV1	Transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 1
TXA₂	Tromboxano A ₂
VSG	Velocidade de sedimentação globular

SUMÁRIO

1	Introdução	20
2	Revisão Bibliográfica	22
2.1	Artrite Reumatoide	22
2.2	Artrite Reumatoide e Disfunções Temporomandibulares	25
2.3	15d-PGJ₂	27
3	Objetivo Geral	31
3.1	Objetivos Específicos	31
4	Material e Métodos	32
4.1	Animais	32
4.2	Fármacos	32
4.3	Procedimentos Gerais	32
4.4	Protocolo de imunização com mBSA, curva dose-tempo e tratamento com a 15d-PGJ₂	33
4.5	Teste da Formalina na ATM	33
4.5.1	Injeções na região da ATM	34
4.5.2	Teste comportamental	35

4.5.3	Confirmação do local da injeção da formalina	35
4.6	Quantificação de citocinas nos tecidos envolvidos na ATM	36
4.7	Western Blot	36
4.8	Delineamento Experimental	37
4.9	Análise Estatística	39
5	Resultados	40
5.1	A Artrite Reumatoide induz nocicepção na ATM	40
5.2	15d-PGJ₂ inibe a resposta nociceptiva induzida pela Artrite Reumatoide na ATM	42
5.3	15d-PGJ₂ reduz os níveis de KC mas não de TNF-α e IL-1β na ATM com Artrite Reumatoide induzida	43
5.4	15d-PGJ₂ inibiu a expressão da PKA e PKC induzida pela Artrite Reumatoide na ATM	45
6	Discussão	47
7	Conclusão	50
	Referências Bibliográficas	51
	Anexo I – Aprovação do Comitê de Ética	61

1 INTRODUÇÃO:

A Artrite Reumatoide (AR) é uma desordem degenerativa das articulações de etiologia desconhecida que se manifesta periféricamente e simetricamente em múltiplas articulações causando deformação e destruição articular devido à erosão de ossos e cartilagens (CUNHA et al., 2007). O processo inflamatório inicia-se na membrana sinovial e, devido ao seu caráter progressivo, estende-se até as superfícies articulares. Ainda que a etiologia da AR permaneça desconhecida, a literatura sugere que fatores genéticos, fatores ambientais, ação hormonal, desordens autoimunes e quadros infecciosos podem estar relacionados com o desenvolvimento da doença (PEREIRA, 2007). É, portanto, uma afecção sistêmica do tecido conjuntivo, com origem desconhecida que se manifesta, predominantemente, com dano repetido e crônico das estruturas articulares, perarticulares e tendinosas, inflamando o substrato anatômico principalmente da membrana sinovial, que pode ocorrer em todas as idades, especialmente em adultos do sexo feminino (MCINNES e SCHETT, 2007). Estima-se que a prevalência global de adultos com AR esteja perto de 1%, sendo que as mulheres são afetadas de três a quatro vezes mais do que homens, apresentando os sintomas entre 35 a 50 anos de idade. A AR está sempre associada com significativo estado de dor e, por isso, mostra-se como fator importante na limitação do dia a dia dos pacientes e em suas habilidades laborais (CUNHA et al., 2007).

A dor é um dos sinais clássicos do processo inflamatório, no qual, a sensibilização dos nociceptores é um fator determinante (VERRI et al., 2006). A AR é uma doença caracterizada por infiltrado inflamatório crônico na membrana sinovial, que está associado à destruição da cartilagem. Várias evidências indicam uma participação crucial de citocinas pró-inflamatórias em sua patogênese como Interleucina 1 beta (IL-1 β), Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α), Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), Interleucina 6 (IL-6), Interleucina 15 (IL-15) e Interleucina 18 (IL-18) (CANETTI et al., 2003; FELDMAN et al., 1998; MCINNES et al., 1996; MUSSO et al., 1999; THURKOW et al., 1997) o que determinam, dentre outros fatores, a sensibilização dos nociceptores caracterizando o processo doloroso (VERRI et al., 2006).

A AR é uma desordem sistêmica a qual pode envolver várias articulações incluindo a articulação temporomandibular (ATM). A ATM quando afetada pela AR pode produzir dor, rigidez articular e limitação de abertura comprometendo as funções estomatognáticas (AKERMAN et al., 1988; GOUPILLE et al., 1993; LIN et al., 2007). Apesar das discrepâncias relatadas nos estudos sobre a prevalência do envolvimento da ATM nas condições da AR (5 a 88%) (LIN et al., 2007; TWILT et al., 2008) é claro o envolvimento da ATM nesta doença e suas complicações. A literatura justifica esta discrepância de resultados entre os estudos de prevalência devido a uma não padronização os critérios e técnicas de diagnóstico (LIN et al., 2007; TWILT et al., 2008).

Tem sido dada grande importância no papel da 15d-PGJ₂ na regulação do processo inflamatório (CLARK et al., 2000; JIANG; TING e SEED, 1998; RICOTE et al., 1998a; RICOTE et al., 1999; WILLOUGHBY; MOORE e COLVILLE-NASH, 2000), devido a possibilidade de intervenção farmacológica ser aplicada na regulação da produção de citocinas. A 15d-PGJ₂, um dos derivados do metabolismo da Prostaglandina D₂ (PGD₂) e um ligante natural do Receptor de Ativação de Proliferação de Peroxissomo- γ (PPAR- γ), (FORMAN et al., 1995; RICOTE et al., 1998b), possui um importante papel na regulação da reação inflamatória *in vivo*. Nesse sentido, estudo prévio (PENA-DOS-SANTOS et al., 2009) demonstrou que a 15d-PGJ₂ apresenta um potente efeito antinociceptivo e anti-inflamatório na ATM através da ativação dos receptores PPAR- γ . Os resultados ainda sugerem que o efeito antinociceptivo da 15d-PGJ₂ na ATM é também mediado pelos receptores opioides kappa e delta através da ativação da via intracelular L-Arginine/NO/cGMP/K⁺_{ATP}. As propriedades farmacológicas da administração periférica da 15d-PGJ₂ demonstradas destacam o uso em potencial desse agonista de receptores PPAR- γ nas condições inflamatórias da ATM.

Considerando a dificuldade de um correto diagnóstico assim como a elaboração de procedimentos terapêuticos adequados para as desordens temporomandibulares (DTMs) desencadeadas pela AR, o presente trabalho poderia contribuir para com o conhecimento básico necessário na determinação de um tratamento mais diferenciado das condições dolorosas da ATM.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA:

2.1 Artrite Reumatoide

A AR constitui a principal alteração articular degenerativa e é tida como uma doença autoimune de etiologia desconhecida. É uma doença sistêmica inflamatória crônica que se manifesta na forma de uma poliartrite periférica e simétrica que leva à deformidade e destruição das articulações em virtude da erosão óssea e da cartilagem. Isto pode acontecer nas grandes e pequenas articulações em associação com manifestações sistêmicas, como cansaço, mal-estar e limitação nas atividades diárias (BRENOL et al., 2007; CUNHA et al., 2007; MCCOY; WICKS e AUDOLY, 2002; MOTA; LAURINDO e SANTOS NETO, 2010). Em alguns casos outros órgãos e sistemas, além das articulações, podem estar envolvidos, como os olhos (uveíte), pulmões (pneumonite), glândulas salivares e lacrimais (síndrome de Sjögren) e sistema nervoso periférico (neuropatias) (SILVA et al., 2003).

Devido à sua morbidade, a AR é uma doença com significativo impacto social. Tanto para o indivíduo acometido quanto para a sociedade, a AR acarreta considerável ônus socioeconômico (MOTA; LAURINDO e SANTOS NETO, 2010), considerando a frequente incapacidade para o trabalho e as limitações de atividades sociais, de lazer e profissionais que a doença determina (PEREIRA, 2007). Em decorrência destes fatores, os pacientes portadores de AR têm apresentado alta mortalidade, proporcional à gravidade do quadro - pacientes com formas poliarticulares podem ter sobrevida de apenas 40% em 5 anos (MOTA; LAURINDO e SANTOS NETO, 2010). As causas de morte descritas com maior frequência são doenças cardiovasculares (DCV) e cerebrovasculares, infecções, doenças linfoproliferativas e complicações gastrintestinais. Dentre os fatores preditivos de mortalidade, estão inclusos idade avançada, incapacidade funcional, número de articulações acometidas, fator reumatoide positivo, nódulos reumatoides e velocidade de sedimentação globular (VSG) elevada (BRENOL et al., 2007).

A AR atinge cerca de 0,5 a 1% da população mundial (podendo chegar a 5% dependendo do grupo e da faixa etária estudados), apresentando uma incidência de 0,02 a 0,05%; sendo sua ocorrência observada em todos os grupos étnicos (MOTA;

LAURINDO e SANTOS NETO, 2010; SILVA et al., 2003; MCCOY; WICKS e AUDOLY, 2002; BRENOL et al., 2007; PEREIRA, 2007). Embora a AR possa ter início em qualquer idade, o grupo com pico de incidência varia entre 35, 40 a 50, 70 anos, sendo as mulheres afetadas três a quatro vezes mais que os homens (SILVA et al., 2003; CUNHA et al., 2007. RUBBERT-ROTH e FINCKH, 2009).

Ainda que a etiologia da AR permaneça desconhecida, a literatura sugere que fatores genéticos, fatores ambientais, ação hormonal, desordens autoimunes e quadros infecciosos podem estar relacionados com o desenvolvimento da doença (PEREIRA, 2007). Nesse sentido, a literatura tem correlacionado a presença de infecções com o aparecimento da AR, dentre os agentes infecciosos sugeridos cabe ressaltar o parvovírus, o vírus da rubéola, o vírus Epstein-Barr e a *Borrelia burgdorferi* (PEREIRA, 2007).

É, portanto, uma afecção sistêmica do tecido conjuntivo, com origem desconhecida que se manifesta, predominantemente, com dano repetido e crônico das estruturas articulares, perarticulares e tendinosas, inflamando o substrato anatômico principalmente da membrana sinovial, que pode ocorrer em todas as idades, especialmente os adultos jovens do sexo feminino (MCINNES e SCHETT, 2007).

A AR é uma doença inflamatória crônica com patogênese autoimune que resulta em destruição da cartilagem e osso, sendo caracterizada por infiltrado de neutrófilos, células T, células B e macrófagos na sinóvia e fluido nos espaços periarticulares (HARRIS, 1990). A importância das citocinas e quimiocinas na fisiopatologia da artrite reumatoide foi demonstrada tanto em humanos quanto em modelos animais (FELDMANN; BRENNAN e MAINI, 1996). De fato, vários desses mediadores têm sido encontrados no líquido sinovial de pacientes com artrite, como o TNF- α , a IL-1 β e a Interleucina-8 (IL-8/CXCL8) (BRENNAN et al., 1991; DI GIOVINE et al., 1988; FONTANA et al., 1982). As citocinas estão diretamente relacionadas em muitos dos processos imunológicos que são associados com a patogênese da AR. A membrana sinovial reumatoide produz ampla matriz de citocinas de macrófagos e fibroblastos, incluindo IL-1, IL-6, IL-15, IL-18, TNF- α , GM-CSF, várias quimiocinas, e muitos outros. (FIRESTEIN, 2003; MCINNES e SCHETT, 2007). Assim, a doença se caracteriza pela inflamação crônica da membrana sinovial, podendo levar a destruição ósteo-articular, que ao longo do tempo resulta em danos para as articulações, causando dor e incapacidade.

Os mecanismos envolvidos na hipernocicepção inflamatória podem ser divididos em duas fases. A primeira fase é caracterizada por eventos não neuronais, onde células do sistema imunológico (macrófagos e leucócitos) produzem uma sequência de mediadores inflamatórios iniciados pelo TNF- α , que induz a produção de IL-6 e IL-1 β , que, por sua vez, estimulam a formação de produtos da ciclooxigenase através da indução enzimática da Ciclooxigenase 2 (COX-2) resultando principalmente na produção de Prostaglandina E₂ (PGE₂). O TNF- α também é capaz de induzir a liberação de quimiocinas que estimulam a liberação/produção de aminas simpáticas. (CUNHA et al., 1991; CUNHA et al., 1992; FERREIRA et al., 1988; FERREIRA et al., 1993a; FERREIRA; LORENZETTI e POOLE, 1993b; LORENZETTI et al., 2002).

A literatura tem demonstrado, através de diferentes modelos experimentais, que os mediadores inflamatórios TNF- α (NORDAHL; ALSTERGREN e KOPP, 2000), IL-1 β (ALSTERGREN et al., 1998;. KOPP, 1998), prostaglandinas (OMOTE et al., 2002; PORTANOVA et al., 1996) e também o Fator de Crescimento Neural (NGF), (MA e WOOLF, 1997) estão envolvidos no início da hipernocicepção que segue o desafio com o antígeno.

A segunda fase da hipernocicepção inflamatória inclui os eventos neuronais: mediadores primários específicos, especialmente os eicosanoides e as aminas simpáticas, são liberados e atuam sobre os receptores metabotrópicos de membrana dos neurônios para desencadear a ativação das vias de segundo mensageiro (AMPc, Proteoquinase A - PKA - e da Proteoquinase C - PKC). As vias do segundo mensageiro ativadas resultam na posterior fosforilação dos canais de sódio voltagem-dependentes e inibição dos canais de potássio voltagem-dependentes. Por conseguinte, o limiar de nociceptores é reduzido e, finalmente, leva a um aumento da excitabilidade da membrana neuronal, facilitando a ativação do nociceptor e a transmissão do impulso pelos neurônios nociceptivos primários. (ALEY E LEVINE, 1999; CUNHA et al., 2005; EVANS; VASKO e NICOL, 1999; GOLD et al., 1998; KHASAR et al, 1999; NAPIMOGA et al., 2008).

2.2 Artrite Reumatóide e Disfunções Temporomandibulares

A ATM tem uma anatomia e função mais complexa dentre todas as articulações do corpo humano. A ATM pode ser considerada diartrose, dividida pelo disco articular em dois compartimentos, um superior e um inferior. A cápsula articular é composta de tecido conjuntivo fibroso, reforçada lateralmente pelo ligamento temporomandibular. A inserção posterior do disco na lâmina timpânica, a zona bilaminar, é composta de duas lâminas contendo elastina, a única proteína fibrosa do organismo que contém um verdadeiro módulo de elasticidade. Essa organização permite grande liberdade de movimento ântero-posterior do disco. Os dois feixes do músculo pterigoideo lateral inserem-se no colo do côndilo (feixe inferior) e no disco (feixe superior). O movimento simultâneo do côndilo e do disco articular, pela ação harmoniosa do pterigoideo lateral, permite o posicionamento do côndilo sob a banda intermediária de Rees, na abertura e fechamento bucal. A cápsula é bem vascularizada e inervada. O suprimento vascular é pela artéria temporal superficial. A inervação sensitiva deve-se ao auriculotemporal, massetérico e ramos temporais profundos do nervo mandibular. O interior da cápsula é revestido por membrana sinovial, que secreta o líquido sinovial, responsável pela lubrificação e nutrição da articulação. A ATM é circundada por muitas estruturas de importância. Medialmente e inferiormente, transita a artéria maxilar interna; posteriormente, a artéria e a veia temporal superficial, juntamente com o nervo auriculotemporal. Lateralmente e inferiormente, situa-se o nervo facial. (BAUER, 1940; MARTINS, 1993)

A AR é uma desordem sistêmica a qual pode envolver várias articulações do corpo incluindo a ATM. A ATM quando afetada pela AR pode produzir dor, inchaço, crepitação, rigidez articular e limitação de abertura comprometendo as funções estomatognáticas (AKERMAN et al., 1988; CELIKERL; GOKQE-KUTSALL e ERYILMAZ, 1995; COOK et al., 1958; GOUPILLE et al., 1993; LIN et al., 2007; YOKOYAMA e OKU, 1999).

Sabemos que na AR, a articulação é tomada pela infiltração de células T, macrófagos e células plasmáticas e ativação de um grande número de citocinas, especialmente o TNF- α que tem efeitos sobre a degradação da cartilagem e do osso e na dor, induzindo a produção de outras citocinas como IL-1 e IL-6. (KOPP et al., 2005)

As primeiras mudanças durante a AR na ATM ocorrem na membrana sinovial, que se torna hiperêmica e infiltrada com linfócitos e células plasmáticas. Também é observado um espessamento da membrana e acúmulo de líquido na cavidade articular. O exame clínico mostra uma ATM inchada e sensível. Dor e espasmo muscular podem limitar o movimento articular. Alterações radiográficas podem não ser perceptível nesta fase inicial. Quando o envolvimento da ATM é progressivo, a cartilagem e o osso sofrem erosão. As adesões podem se formar entre a membrana sinovial e o ligamento capsular. Observa-se um achatamento característico na superfície anterior do côndilo mandibular, devido à destruição da fibrocartilagem e osso. A erosão da inserção ligamentar do músculo pterigoideo lateral ocorre em conjunto com o tecido ósseo e cartilaginoso (MARBACH e SPIERA, 1967). Apesar de a ATM estar ocasionalmente incluída nos estudos de progressão radiográfica das doenças inflamatórias crônicas como a AR, as alterações radiológicas mais frequentes são o estreitamento do espaço comum e erosões marginais e, na doença avançada, osteólises extensas e até mesmo a destruição completa do côndilo. (GYNTHER et al., 1997; MELCHIORRE et al., 2003; NORDAHL et al., 2001; SMITH; LARHEIM e ASPESTRAND, 1992).

Considerando o exposto acima, a severidade das disfunções temporomandibulares na AR podem levar a sequelas graves. Assim, o diagnóstico precoce assim como o manejo apropriado se faz necessário. A magnitude do envolvimento da ATM está relacionado à severidade da AR. Os níveis do fator reumático, sedimentação de eritrócitos, proteína C-reativa e TNF- α estão correlacionados com a severidade das disfunções temporomandibulares (CELIKERL; GOKQE-KUTSALL e ERYILMAZ, 1995; LIU et al., 2003; VOOG et al., 2003; YOSHIDA et al., 1998)

Apesar das discrepâncias relatadas nos estudos sobre a prevalência do envolvimento da ATM nas condições da AR (5 a 88%) (CELIKERL; GOKQE-KUTSALL e ERYILMAZ, 1995; FRANKS, 1969; LIN et al., 2007; MARBACH e SPIERA, 1967; TWILT et al., 2008;) é claro o envolvimento da ATM na AR e suas complicações. A literatura justifica esta discrepância de resultados entre os estudos de prevalência devido a uma não padronização dos critérios e técnicas de diagnóstico (CELIKERL; GOKQE-KUTSALL e ERYILMAZ, 1995; LIN et al., 2007; TWILT et al., 2008).

Outro fator a ser considerado é que as disfunções temporomandibulares na AR são frequentemente ignoradas pelos reumatologistas ou pelos próprios pacientes, uma vez que os tratamentos são centrados em outras articulações, especialmente dos membros inferiores e nas mãos, além disso ainda temos as limitações das técnicas de diagnóstico para a ATM com AR (ARABSHAHI e CRON, 2006; MELCHIORRE et al., 2003).

2.3. 15d-PGJ₂

Os eicosanoides (prostanoides, leucotrienos e lipoxinas) são metabólitos biologicamente ativos derivados do Ácido Araquidônico (AA). As prostaglandinas são produzidas pela ação da enzima ciclooxigenase utilizando-se do AA como substrato. Em condições fisiológicas, o AA encontra-se estereificado nos fosfolipídios de membrana sendo mobilizado durante o processo inflamatório pela fosfolipase A₂ que é ativada por estímulos químicos, mecânicos e produtos bacterianos.

Ciclooxigenases catalisam a conversão do AA em prostaglandina H₂, o primeiro passo na biossíntese de prostanoides, a qual é convertida por células específicas (várias sintases específicas para cada prostanóide) em produtos biologicamente ativos incluindo PGE₂, PGF_{2α}, PGI₂, PGD₂ e tromboxano TXA₂ (FUNK, 2001). Existem duas isoformas principais COX: COX-1 constitutivamente e COX-2 induzida. Considerando que a COX-1 é constitutivamente expressa em maioria dos tecidos, a expressão da COX-2 é induzida por vários estímulos, como mitógenos, citocinas e os promotores de tumor (GRAU; IÑIGUEZ e FRESNO, 2004).

Gilroy et al. (1999) demonstraram que durante o início do processo inflamatório, no qual predominantemente encontramos polimorfonucleares, a COX-2 sintetiza a PGE₂, a qual possui um papel pró-inflamatório. Entretanto, após esta fase inicial, ocorre uma inversão de predominância celular na qual os mononucleares se destacam. Nessa segunda fase, aparentemente, a COX-2 participa da resolução da fase aguda da inflamação, para prevenir os efeitos adversos da resposta inflamatória, pela alternância do padrão de prostaglandina (PG) sintetizada, passando a estimular a produção de PG da família J. (KIM, W. J; KIM J. H. e JANG, 2007)

Tem sido dada grande importância no papel da 15d-PGJ₂ na regulação do processo inflamatório, devido a possibilidade de intervenção farmacológica ser aplicada na regulação da produção de citocinas (CLARK et al., 2000; JIANG; TING e SEED, 1998; RICOTE et al., 1998a; RICOTE et al., 1999; WILLOUGHBY; MOORE e COLVILLE-NASH, 2000).

O prostanóide 15-desoxi- Δ 12,14 prostaglandina J₂ (15d-PGJ₂) é particularmente interessante, pois é um tipo de prostaglandina-ciclopentenônicas formada *in vivo* através da desidratação não enzimática de prostaglandina D₂ produzida por vários tipos de células. Essas ciclopentenônicas podem alterar as funções celulares por múltiplos mecanismos. A 15d-PGJ₂ parece inibir a expressão de uma variedade de genes pró-inflamatórias, incluindo a COX-2. Esses efeitos parecem ser mediados pela inibição de vários fatores de transcrição, como o Fator nuclear- κ B e a Proteína ativadora 1 (AP-1). Além disso, a 15d-PGJ₂ é um ligante natural do receptor de ativação de proliferação de peroxissomo- γ (PPAR- γ) (GRAU; IÑIGUEZ e FRESNO, 2004; LEVONEN et al., 2001, SÁNCHEZ-GÓMEZ et al., 2004; YEUN OH et al., 2008; FORMAN et al., 1995; RICOTE et al., 1998b), o que sugere que essa molécula possui um importante papel na regulação da reação inflamatória *in vivo*.

O PPAR pertence a uma subfamília de receptores nucleares e consiste de três diferentes isoformas as quais são codificados por diferentes genes além de possuírem diferentes promotores; são eles: PPAR- α , PPAR- β/δ e PPAR- γ (ZHU et al., 1995). As PPARs possuem papel importante na transdução de sinais ambientais, inflamatórios, metabólicos e de desenvolvimento dentro de uma cascata de respostas celulares ao nível da transcrição de genes (PHULWANI et al, 2006)

As três isoformas possuem padrões distintos em relação à distribuição celular e de tecidos. Originalmente, sabia-se que o PPAR- γ era expresso em adipócitos e hepatócitos, porém atualmente, sabe-se que o PPAR- γ é encontrado em macrófagos/monócitos, miócitos, fibroblastos e células precursoras de medula (BRAISSANT et al., 1996; CLARK et al., 2000).

Acredita-se que o PPAR- γ em estado inativado esteja conjugado com proteínas corepressoras, localizado no citoplasma ao invés do núcleo (BISHOP-BAILEY e HLA, 1999).

A ligação do PPAR e a 15d-PGJ₂ induz a dissociação do PPAR de seus repressores e permite a interação com coativadores (p. ex., receptores esteroides), o que resulta na translocação deste do citoplasma para o núcleo (ZHU et al., 1995). O resultado dessa translocação é a ativação da expressão ou repressão de uma variedade de genes (NEGISHI e KATOH, 2002).

Entretanto, a 15d-PGJ₂ aparentemente possui a capacidade de produzir efeitos de maneira independente ao PPAR (CHAWLA et al., 2001, SÁNCHEZ-GÓMEZ et al., 2004). Alguns desses efeitos podem ser mediados por interações covalentes entre a 15d-PGJ₂ e proteínas intracelular. Duas moléculas já foram identificadas como mediadoras da 15d-PGJ₂ de maneira independente do PPAR: o fator nuclear- κ B (NF- κ B) e a via de sinalização ERK (SCHER e PILLINGER, 2005; SÁNCHEZ-GÓMEZ et al., 2004). Além disso, tem sido demonstrado que a 15d-PGJ₂ pode induzir a apoptose em culturas de neurônios corticais, células endoteliais, miofibroblastos hepáticos, granulócito, células de câncer e doenças neuroinflamatórias como a esclerose múltipla, através de PPAR γ dependente ou independente. (XIAN; LIN e REEVES, 2007)

Kawahito (2000), observou que após administração intraperitoneal de ligantes de PPAR- γ , como a 15d-PGJ₂, suprimiu a artrite induzida por adjuvante em ratos, além de reduzir a formação de *pannus* e o infiltrado inflamatório. Também foi observado que a expressão aumentada de PPAR- γ no líquido sinovial de pacientes com artrite, além de macrófagos em menor quantidade, fibroblastos sinoviais e células endoteliais. Experimentos conduzidos por Shan (2004) sugere que a 15d-PGJ₂ induz apoptose em condrócitos através da ativação do PPAR- γ .

Estudos com monócito/macrófago demonstraram que a 15d-PGJ₂ pode ser a responsável pela inibição de genes que codifica IL-1 β , TNF- α , iNOS e metaloproteinase 2 (JIANG; TING e SEED, 1998; MIGITA e MORSER, 2005; RICOTE et al., 1998a). Essas observações vislumbram a possibilidade da 15d-PGJ₂ ser um potencial composto terapêutico para o tratamento de doenças inflamatórias, atenuando o desenvolvimento de inflamação aguda e crônica (CUZZOCREA et al., 2002; MIGITA e MORSER, 2005; NAPIMOGA et al, 2008; PHULWANI et al., 2006) e para aliviar os sintomas de choque séptico (ZINGARELLI et al., 2003), além de apresentar potentes efeitos imunomodulador de diversos tipos celulares, como

monócitos/macrófagos, micróglia, astrócitos, neutrófilos e linfócitos (ASADA *et al.*, 2004; RICOTE *et al.*, 1999; PHULWANI *et al.*, 2006)

Outro estudo não conseguiu demonstrar o efeito inibitório da 15d-PGJ₂ com relação a expressão de TNF- α e IL-6 em culturas de monócitos/macrófagos (THIERINGER *et al.*, 2000). Em estudo realizado utilizando o rosiglitazone, um agonista sintético do PPAR- γ , os autores não conseguiram reduzir a secreção de IL-8 após estimulação com LPS em linhagem celular monocítica, mas observaram a diminuição da expressão de MMP-9. Além disso, a 15d-PGJ₂ induziu a expressão do gene de IL-8 e suprimiu o MCP-1 (ZHANG *et al.*, 2001).

Napimoga *et al.* (2008) observaram pela primeira vez que a 15d-PGJ₂ inibe a hipernocicepção inflamatória via ativação de PPAR- γ . Esse efeito parece ser dependente de opioides endógenos e macrófagos locais. Foi observado que a administração intraplantar da 15d-PGJ₂ (30-300ng/pata), inibe a hipernocicepção mecânica induzida por carragenina (100 μ g/pata) e a atuação da PGE₂, como mediador hipernociceptivo. Além disso, 15d-PGJ₂ (100ng/ATM) também inibe a hipernocicepção induzida por formalina na ATM. Por outro lado, a administração direta da 15d-PGJ₂ no gânglio da raiz dorsal era eficaz no bloqueio da hipernocicepção induzida pela PGE₂. O efeito antinociceptivo da 15d-PGJ₂ foi reforçado pelo aumento da população de macrófagos no tecido da pata devido à injeção local de tioglicolato, sugerindo a participação destas células no efeito antinociceptivo da 15d-PGJ₂.

Estudo recente no nosso laboratório (PENA-DOS-SANTOS *et al.*, 2009) 15d-PGJ₂ apresentou um potente efeito antinociceptivo e anti-inflamatório na ATM através da ativação dos receptores PPAR- γ . Além do mais, esses resultados sugerem que o efeito antinociceptivo da 15d-PGJ₂ na ATM é também mediado pelos receptores opioides kappa e delta através da ativação da via intracelular L-Arginine/NO/cGMP/K⁺_{ATP}. As propriedades farmacológicas da administração periférica da 15d-PGJ₂ demonstradas destacam o uso em potencial deste agonista de receptores PPAR- γ nas condições inflamatórias da ATM.

3 OBJETIVO GERAL:

Avaliar o efeito periférico da 15d-PGJ₂ nas desordens temporomandibulares induzidas pela AR na ATM de ratos.

3.1 OBJETIVO ESPECÍFICOS:

- ✚ Padronizar o modelo experimental para indução da AR na ATM de ratos;
- ✚ Avaliar a nocicepção induzida pela AR na ATM de ratos;
- ✚ Avaliar o efeito periférico da 15d-PGJ₂ na hipernocicepção inflamatória decorrente da AR na Articulação Temporomandibular de ratos.

4 MATERIAL E MÉTODOS:

4.1 Animais:

Para a realização deste trabalho foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), pesando entre 150 – 250g, que foram mantidos em gaiolas plásticas (cinco animais por gaiola) contendo maravalha, em ambiente com controle de luminosidade (ciclos claro/escuro de 12h) com alimentação e água, *ad libitum*.

Todos os procedimentos experimentais realizados neste estudo foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal da Universidade de Uberaba (n° **059/2009**) e estavam de acordo com as diretrizes determinadas pelo Comitê de Ética da Associação Internacional para Estudo da Dor (IASP) em animais conscientes (ZIMMERMANN, 1983).

4.2 Fármacos:

15d-PGJ₂: Calbiochem, San Diego, CA-USA.

Adjuvante Incompleto de Freund - IFA: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO-USA

Adjuvante Completo de Freund - CFA: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO-USA

Proteína Albumina Bovina Sérica metilada - mBSA: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO-USA

Uretano: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO-USA

Alfa-Cloralose: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO-USA

Formalina: Formaldeído 37%, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO-USA

4.3 Procedimentos gerais:

Para administração de drogas na região das ATMs, uma agulha calibre 30, conectada a uma seringa de microlitro Hamilton (50µl) por um tubo de polietileno P20 (Figura 1), foi inserida na porção inferior da borda póstero-inferior do arco zigomático, sendo avançada em direção anterior até contactar a região póstero-lateral do côndilo.



Figura 1: Dispositivo para aplicação de drogas na ATM

4.4 Protocolo de imunização com mBSA, curva dose-tempo e tratamento com a 15d-PGJ₂:

Os animais foram ativamente imunizados com Proteína albumina bovina sérica metilada (mBSA) por meio do seguinte protocolo: cada animal recebeu uma injeção subcutânea de 0,2 ml de uma emulsão contendo 100 µg de mBSA diluída em volumes iguais de Tampão Fosfato Salina (PBS) e Adjuvante Completo de Freund (CFA). Os animais receberam doses de reforço (100µg de mBSA/animal) sete e quatorze dias após o início da imunização, sendo utilizado Adjuvante Incompleto de Freund (IFA) no lugar do CFA. Os animais controle receberam o mesmo tratamento aplicado aos demais, porém sem a administração de mBSA. Sete dias após a terceira imunização em uma das articulações foi administrado 15d-PGJ₂ em tempo e quantidade previamente determinados.

4.5 Teste da Formalina na ATM:

Os testes comportamentais foram realizados na fase clara, em sala silenciosa, com temperatura ambiente mantida a 25°C (ROSLAND, 1991). Durante o teste os animais não tiveram acesso à água ou à comida. Para minimizar o estresse durante as sessões experimentais, os animais foram previamente manipulados pelo pesquisador por um período de sete dias. Para a realização das análises

comportamentais, uma caixa de observação medindo 30x30x30 cm com base e três laterais espelhadas e frente de vidro foi utilizada (Figura 2). Cada animal foi inicialmente colocado e mantido na caixa por 10 minutos para habituar-se ao ambiente de experimentação e minimizar o estresse (ABBOTT; FRANKLIN e CONNELL, 1986).



Figura 2: Caixa de observação utilizada para as análises comportamentais.

4.5.1 Injeções na região da ATM: Para administração de drogas na região da ATM direita (Figura 3), os animais foram brevemente anestesiados por inalação de Halotano.



Figura 3: Injeção na ATM direita do animal anestesiado

4.5.2 Teste comportamental: Imediatamente após a injeção periarticular, o animal, já consciente, foi recolocado na câmara de observação e as respostas comportamentais caracterizadas pelo ato de coçar a região injetada com a pata dianteira ou traseira e pelo ato de levantar reflexamente a cabeça foram quantificadas durante 45 min divididos em 15 blocos de 3 min (Figura 4). O tempo em segundos que o animal permaneceu coçando a região orofacial foi quantificado através da utilização de um cronômetro, e o número de vezes que o animal levantou reflexamente a cabeça foi quantificado usando um contador de células (ROVERONI et al., 2001). Considerando que o ato de levantar reflexamente a cabeça segue um padrão uniforme de um segundo de duração, a intensidade da resposta nociceptiva foi quantificada somando-se esse comportamento ao ato de coçar a região injetada, como previamente padronizado (ROVERONI et al., 2001).

TEMPO	0-3'	3-6'	6-9'	9-12'	12-15'	15-18'	18-21'	21-24'	24-27'	27-30'	30-33'	33-36'	36-39'	39-42'	42-45'
CO															
LC															

CO - comportamento de coçar a região orofacial (segundos)

LC - comportamento de levantar rapidamente a cabeça (número de vezes)

Símbolo (') - Minutos

Figura 4: Tabela utilizada para quantificar o Teste comportamental.

4.5.3 Confirmação do local da injeção de formalina: Para calibração da injeção da ATM dos animais (n=5) após o término de cada análise comportamental foi feita a confirmação visual do local da administração da formalina (*pós-mortem*). Para isso, após indução anestésica através da administração intraperitoneal de uma mistura de uretano e α -cloralose (100mg/kg e 50mg/kg, respectivamente) (HU, 1990), o corante Azul de Evans (1%; 5mg/Kg) foi injetado, intracardiacamente. Após dez minutos, o animal foi submetido à perfusão cardíaca com soro fisiológico. Como o corante Azul de Evans se liga às proteínas plasmáticas, o local da injeção foi identificado visualmente, de acordo com a aparência do corante extravasado (HAAS et al. 1992).

4.6 Quantificação de citocinas nos tecidos envolvidos na ATM:

Amostras dos tecidos da região temporomandibular foram obtidas e homogeneizadas em solução Tampão Fosfato Salina (PBS) contendo 0,4M de NaCl, 0,05% de Tween 20, 0,5% de albumina bovina sérica (BSA), 0,1mM de fenil-metil-sulfonil fluoreto, 0,1mM de cloreto de benztônico, 10mM de EDTA e 20KI/ml de aprotinina (Sigma, USA). Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas (3000 RPM/ 10 min) e o sobrenadante foi utilizado para avaliar a citocina por ELISA. Brevemente, placas de 96 poços foram incubadas “overnight” em temperatura de 4°C com anticorpos contra TNF- α , IL-1 β e KC de rato (10 μ g/ml). No dia seguinte, as placas foram lavadas e incubadas por 2 horas com uma solução a 1% de albumina bovina no intuito de evitar ligações inespecíficas. Após esse bloqueio e lavagem das placas, as curvas-padrão em várias diluições ou as amostras (em triplicata) foram adicionadas e incubadas à temperatura de 4°C por 24h. As placas então foram lavadas três vezes com tampão e os anticorpos policlonais biotinilados contra TNF- α , IL-1 β e KC, diluídos 1:2000 foram adicionados (100 μ l/poço). Após incubação em temperatura ambiente por 1 hora, as placas foram lavadas e 100 μ l de avidina-HRP diluídas 1:5000 foram adicionados. Em seguida (quinze minutos após), 100 μ l de reagente colorido (o-fenilenodiamina-2HCl; OPD, Sigma USA) foram adicionados e as placas foram mantidas no escuro, em temperatura ambiente, por 15-20 min. A reação enzimática foi interrompida com H₂SO₄ 1M e as absorbâncias foram determinadas em 490nm.

4.7 Western Blot:

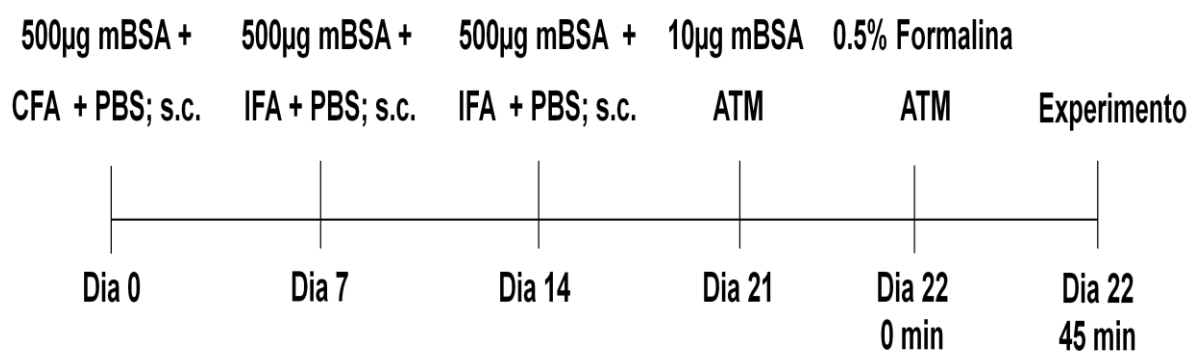
Para extração de proteínas, as amostras do tecido periarticular foram pesadas e homogeneizadas em 3ml/g de tecido de tampão RIPA (RIPA Lysis buffer, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) contendo inibidores de proteases, mantido em um banho com gelo, utilizando homogeneizador. O homogeneizado foi incubado em gelo por 30 min., transferido para microtubos e centrifugado a 10.000 rpm por 10 min. a 4°C. O sobrenadante foi removido e centrifugado novamente. A quantificação de proteínas total nos extratos foi realizada através do método do Kit BCA, Pierce. Em seguida as proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida

SDS-PAGE 10% e transferidas para membranas de nitrocelulose. As membranas foram incubadas "overnight" a 4°C com tampão de bloqueio (PBS 5% (p/v) de leite desnatado e 0,1% Tween 20). As membranas foram lavadas três vezes com PBS 0,1% Tween 20. Em seguida foram incubadas em solução de PBS contendo 5% de leite desnatado e 0,1% Tween 20 contendo anticorpo anti PKA, anti PKC, ou anti α -tubulina (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). Após a lavagem, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado HRP e novamente lavadas. As membranas foram então reveladas com kit de quimioluminescência (ECL, Amershan Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK) como descrito no manual de instruções. Os filmes foram scaneados através do sistema de análise de imagens Image Quant 5.2. A especificidade das bandas foram determinadas pela omissão do anticorpo primário seguindo o protocolo do Western Blot. A normalização da quantificação protéica foi feita através da divisão da intensidade das bandas teste com a intensidade das bandas marcadas pela alfa tubulina (controle positivo).

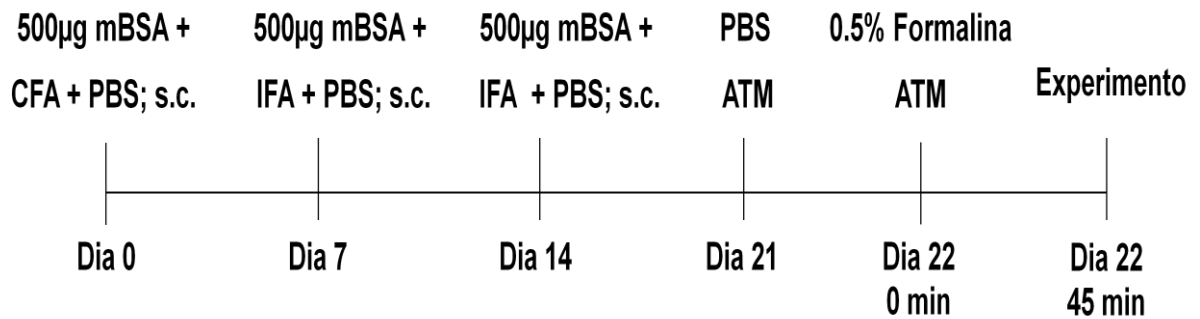
4.8 Delineamento Experimental:

Foram realizados os seguintes grupos:

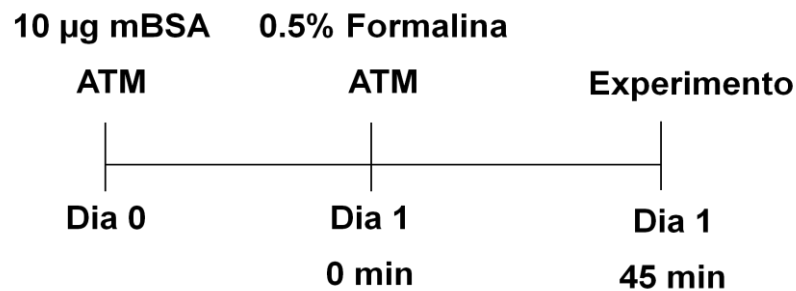
Grupo 01: Injeção subcutânea 0.2ml de 500 μ g/mBSA + 100 μ L/CFA + 100 μ L/PBS (Dia 0). Injeção subcutânea 0.2ml de 500 μ g/mBSA + 100 μ L/IFA + 100 μ L/PBS (Dia 7 e 14). Injeção Intra-articular na ATM de 10 μ g/mBSA + 15 μ L/PBS (Dia 21) e Formalina 0,5% (Dia 22) (n=5)



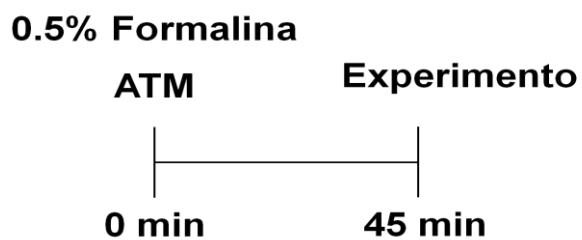
Grupo 02: Injeção subcutânea 0.2ml de 500µg/mBSA + 100µL/CFA + 100µL/PBS (Dia 0). Injeção subcutânea 0.2 ml de 500µg/mBSA + 100µL/IFA + 100µL/PBS (Dia 7 e 14). Injeção Intra-articular na ATM de PBS (Dia 21) e Formalina 0,5% (Dia 22) (n=5)

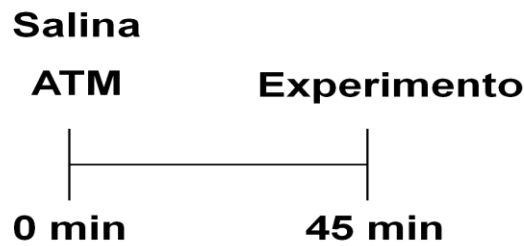


Grupo 03: Injeção Intra-articular na ATM de 10µg/mBSA (Dia 0) e Formalina 0,5% (24 horas) (n=5)

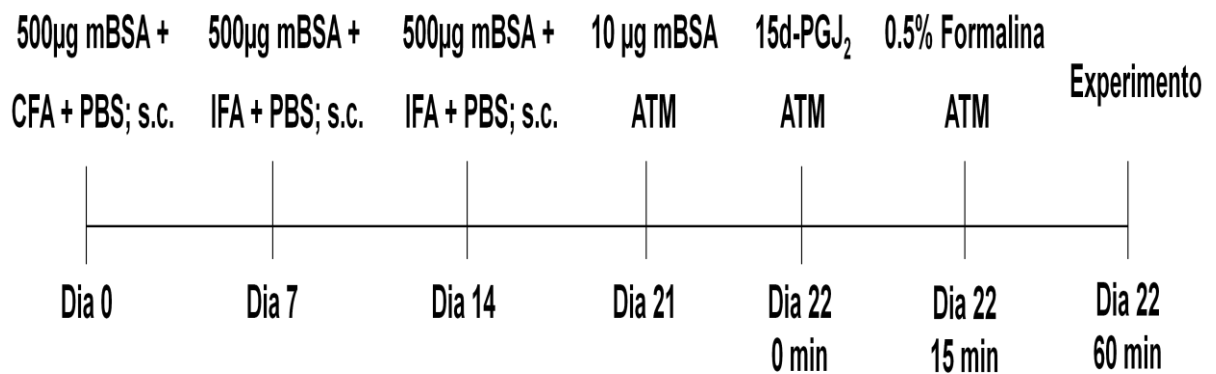


Grupo 04: Injeção Intra-articular na ATM de Formalina 0.5% (n=5)



Grupo 05: Injeção Intra-articular na ATM de Salina (n=5)

Grupo 06: Injeção subcutânea 0.2ml de 500µg/mBSA + 100µL/CFA + 100µL/PBS (Dia 0). Injeção subcutânea 0.2ml de 500µg/mBSA + 100µL/IFA + 100µL/PBS (Dia 7 e 14). Injeção Intra-articular na ATM de 10µg/mBSA + 15µL/PBS (Dia 21) e 100, 300 ou 30ng 15d-PGJ₂ (Dia 22) + 15 minutos seguintes: Formalina 0,5% (Dia 22) (n=5)

**4.9 Análise Estatística:**

Os dados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) e as comparações múltiplas foram feitas pelo teste de Tukey. Para todos os testes o nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$. Os dados foram apresentados pela média \pm o Erro Padrão. O programa GraphPad Prism 4.0 foi utilizado para a realização dos cálculos estatísticos.

5 RESULTADOS:

5.1 A Artrite Reumatoide induz nocicepção na ATM:

A injeção intra-articular de mBSA, mas não de PBS (controle), em ratos imunizados induziu comportamentos nociceptivos de forma dose e tempo dependente (Figura 5A e 5B, respectivamente). O desafio com mBSA induziu um resposta nociceptiva significativa depois de 12 horas, mantendo um patamar até 24 horas ($p < 0.05$), seguindo por um declínio com 48 horas após o desafio. (Figura 5A e 5B, respectivamente). Dessa maneira o pico de respostas comportamentais nociceptivas foi obtido por meio do mBSA 10 μ g/ATM após 24h, parâmetros que foram utilizados nos experimentos seguintes.

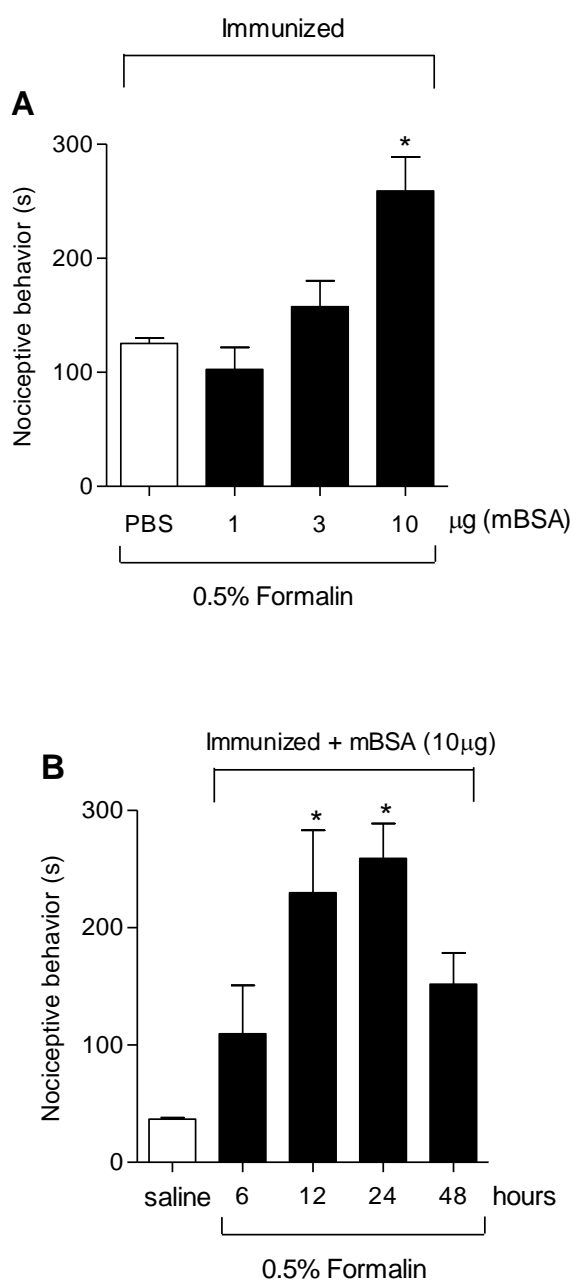


Figura 5 - A Artrite Reumatoide induz nociceção na ATM: (A) Injeção intra-articular de mBSA (10µg) na ATM de ratos imunizados aumentou significativamente a magnitude da resposta nociceptiva de uma dose sublimiar de formalina (0,5%). O símbolo (*) indica resposta nociceptiva significativamente maior ($p < 0,05$, ANOVA, teste de Tukey). (B) Injeção intra-articular de mBSA (10µg) induziu resposta nociceptiva significativamente maior que o grupo salina entre 12 e 24 horas ($p < 0,05$, ANOVA, teste de Tukey) apresentando um declínio depois de 48 horas. Os valores estão expressos pela Média \pm EPM. O símbolo (*) indica resposta nociceptiva significativamente maior ($p < 0,05$, ANOVA, teste de Tukey) em relação ao grupo salina (controle).

5.2 15d-PGJ₂ inibe a resposta nociceptiva induzida pela Artrite Reumatoide na ATM:

O comportamento nociceptivo induzido pela Formalina (0,5%) nos animais imunizados e desafiados com mBSA (Figura 6, coluna 5, 10 μ g/ATM, 24 horas antes) foi significativamente maior ($p < 0,05$) em relação aos demais grupos. Por outro lado, o pré-tratamento (15min) com 15d-PGJ₂ (30, 100 e 300ng/ATM) inibiu o comportamento nociceptivo induzido pela AR na ATM. De acordo com esses resultados juntamente com resultados de estudos anteriores (PENA-DOS-SANTOS et al., 2009), foi estabelecido que a dose efetiva da 15d-PGJ₂ para inibir a nocicepção induzida pela AR induzida na ATM é de 100ng/ATM. Sendo assim, para os seguintes experimentos a concentração de 15d-PGJ₂ utilizada foi de 100ng/ATM.

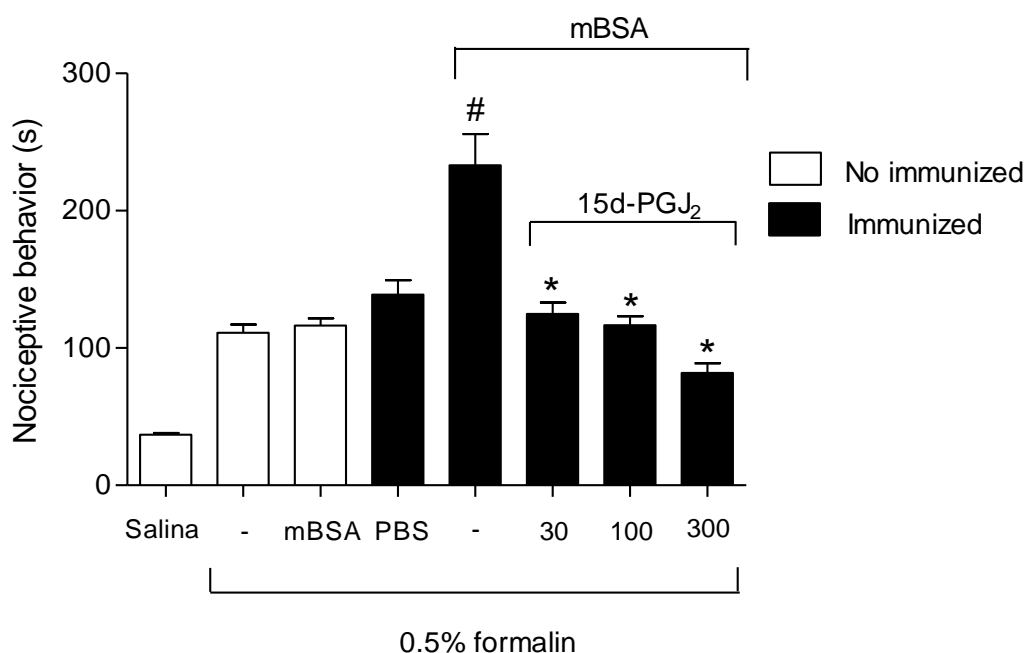


Figura 6 – 15d-PGJ₂ inibe a resposta nociceptiva induzida pela Artrite Reumatoide na ATM. O pré-tratamento (15min) com 15d-PGJ₂ (30, 100 e 300 ng/ATM) reduziu significativamente as resposta nociceptivas induzidas pela AR na ATM. Não houve diferença estatística entre os grupos tratados com 15d-PGJ₂. O símbolo (#) indica uma resposta nociceptiva significativamente maior que os demais grupos ($p < 0,05$, ANOVA, teste de Tukey) em relação aos demais grupos. O símbolo (*) indica uma resposta nociceptiva significativamente menor em relação ao grupo de ratos imunizados + mBSA + formalina 0,5% ($p < 0,05$, ANOVA, teste de Tukey).

5.3 15d-PGJ₂ reduz os níveis de KC mas não de TNF- α e IL-1 β na ATM com Artrite Reumatoide induzida:

Nenhuma das três doses utilizadas de 15d-PGJ₂ foram capazes de reduzir a liberação de TNF- α (Figura 7A) e IL-1 β (Figura 7B) induzido pelo desafio de mBSA nos animais imunizados, no entanto, a 15d-PGJ₂ reduziu significativamente a liberação de quimiocina derivada de queratinócito (KC) ($p < 0,05$). (Figura 7C)

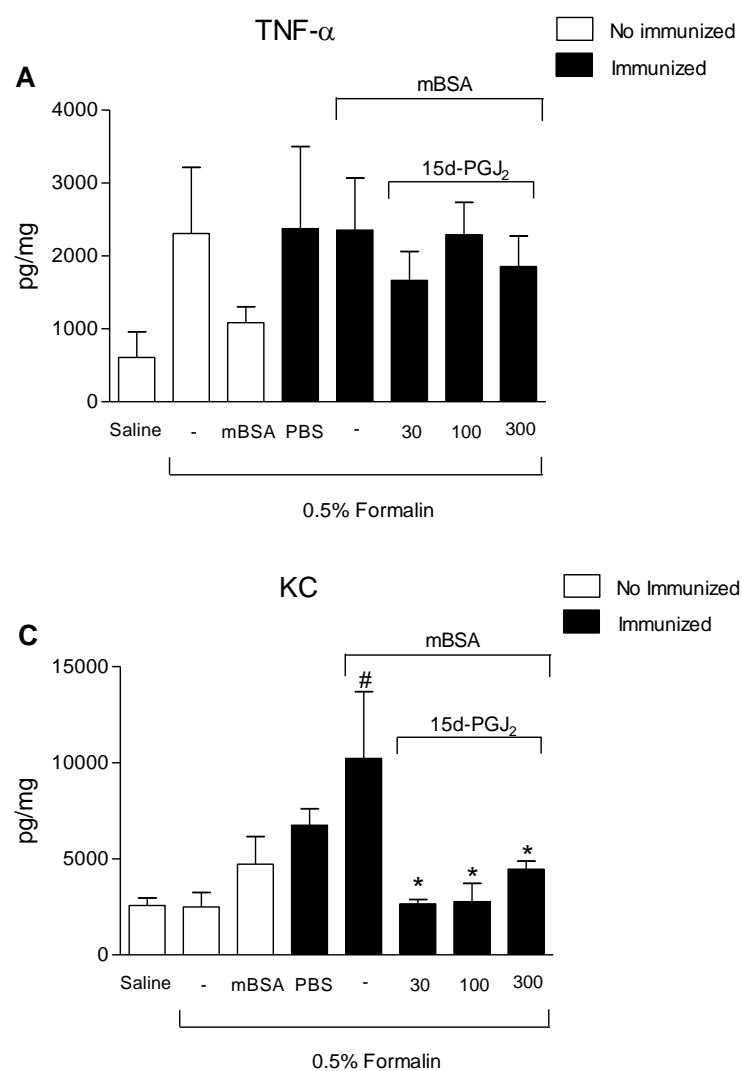


Figura 7 – 15d-PGJ₂ reduz os níveis de KC mas não de TNF- α e IL-1 β na ATM com Artrite Reumatoide induzida: (A) O pré-tratamento (15min) com 15d-PGJ₂ (30, 100 e 300 ng/ATM) na ATM com artrite induzida não afetou a liberação da citocina TNF- α ($p > 0.05$, ANOVA, teste de Tukey). (B) O pré-tratamento (15min) com 15d-PGJ₂ (30, 100 e 300 ng/ATM) na ATM com artrite induzida não afetou a liberação da citocina IL-1 β ($p > 0.05$, ANOVA, teste de Tukey). (C) O pré-tratamento (15 min) com 15d-PGJ₂ (30, 100 e 300 ng/ATM) na ATM com artrite induzida reduziu significativamente a liberação quimiocina KC ($p > 0.05$, ANOVA, teste de Tukey). O símbolo (*) indica resposta nociceptiva significativamente menor ($p < 0.05$, ANOVA, teste de Tukey) quando comparado com o grupos ratos imunizados + mBSA + formalina 0,5%.

5.4 15d-PGJ₂ inibiu a expressão da PKA e PKC induzida pela Artrite Reumatoide na ATM:

Análise pelo Western Blot demonstrou uma expressão significativamente maior das proteinoquinases PKA e PKC na ATM dos ratos imunizados e desafiados com mBSA (Figura 8). O pré-tratamento (15min) com 15d-PGJ₂ (100ng/ATM) na ATM com artrite induzida reduziu significativamente a expressão da PKA assim como da PKC.

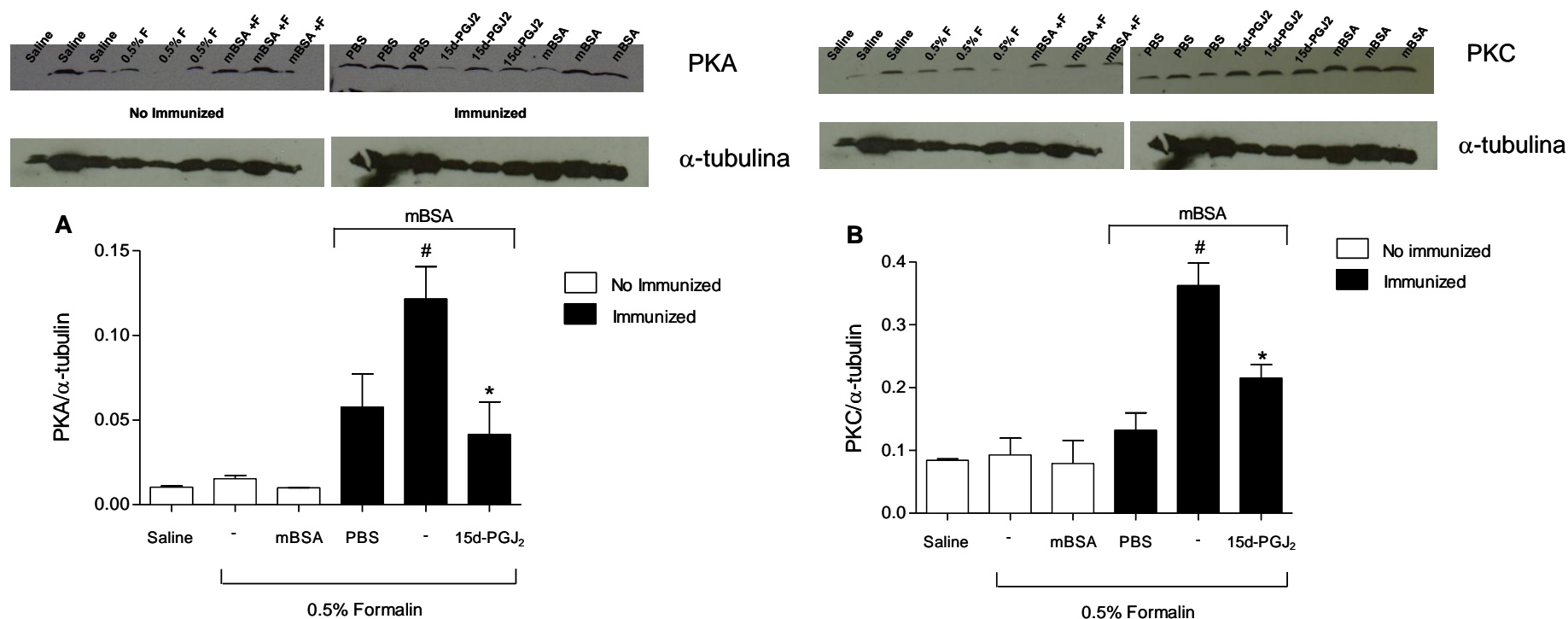


Figura 8 – 15d-PGJ₂ inibe a expressão de PKA e PKC na AR induzida na ATM. (A) pré-tratamento (15min) com 15d-PGJ₂ (100 ng/ATM) reduziu significativamente a expressão de PKA na AR induzida na ATM. O símbolo (#) indica uma expressão significativamente maior de PKA ($p < 0,05$, ANOVA, teste de Tukey) do grupo controle. O símbolo (*) indica uma expressão significativamente menor de PKA do que ratos imunizados + mBSA + formalina 0,5% ($p < 0,05$, teste T). (B) O pré-tratamento (15min) com 15d-PGJ₂ (100 ng/ATM) reduziu significativamente a expressão de PKC na AR induzida na ATM. O símbolo (#) indica uma expressão significativamente maior de PKC ($p < 0,05$, ANOVA, teste de Tukey) do grupo controle. O símbolo (*) indica uma expressão significativamente menor de PKC do que ratos imunizados + mBSA + formalina 0,5%

6 DISCUSSÃO:

A AR é uma desordem sistêmica a qual pode envolver várias articulações do corpo incluindo a ATM. A ATM quando afetada pela AR pode produzir dor, inchaço, crepitação, rigidez articular e limitação de abertura comprometendo as funções estomatognáticas (AKERMAN et al., 1988; CELIKERL; GOKQE-KUTSALL e ERYILMAZ, 1995; COOK, 1958; GOUPILLE et al., 1993; LIN et al., 2007; YOKOYAMA e OKU, 1999). Nesse sentido, o presente estudo demonstrou que os animais com AR induzida por mBSA (10µg/mBSA) apresentaram hipernocicepção inflamatória. A injeção intra-articular de solução de formalina 0,5% (dose sublimiar) induziu uma resposta comportamental nociceptiva significativamente maior nos animais com AR induzida em relação a todos os controles.

Para a realização deste estudo foi utilizado o modelo experimental de Artrite induzida por antígeno (AIA), sendo a proteína albumina bovina sérica metilada (mBSA) utilizada na forma de antígeno solúvel associada ao adjuvante de Freund. Este modelo mostrou-se eficaz em demonstrar as condições de dor induzidas pela AR na ATM corroborando a literatura (AKERMAN et al., 1988; CELIKERL; GOKQE-KUTSALL e ERYILMAZ, 1995; COOK, 1958; GOUPILLE et al., 1993; LIN et al., 2007; YOKOYAMA e OKU, 1999).

Os resultados demonstraram que a resposta nociceptiva foi significativamente maior 12 horas após a indução da AR com mBSA na ATM dos animais imunizados. A resposta nociceptiva aumentada mantém-se até 24 horas após o desafio com mBSA na ATM, entrando em declínio após 48 horas do desafio. Dessa maneira, para viabilizar o estudo da resposta dolorosa induzida pela AR na ATM e os possíveis mecanismos nesse processo, foi padronizado a execução dos experimentos 24 horas após o desafio com mBSA na ATM de animais imunizados. A hipernocicepção induzida pela AR na ATM é condizente com o quadro clínico da doença (AKERMAN et al., 1988; GOUPILLE et al., 1993; LIN et al., 2007).

Considerando o importante papel de citocinas e quimiocinas no desenvolvimento da hipernocicepção inflamatória (CUNHA et al., 2005; VERRI et al., 2006) e o fato de as mesmas serem mediadores fundamentais na patogênese da AR (BRENNAN e MCINNES, 2008; PALMBLAD et al., 2002) foi investigada a participação das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , KC e TNF- α na ATM de ratos com

AR induzida. Os resultados demonstraram um aumento significativo na expressão das citocinas IL-1 β e KC no tecido periarticular dos animais imunizados, no entanto, apesar de ter sido demonstrado um aumento na expressão da citocina TNF- α nos animais imunizados, esse não demonstrou diferença estatística em relação ao grupo controle. Em adição a estes experimentos, análises através de Western Blot demonstraram que a nocicepção da ATM induzida pela AR está relacionada com o aumento da expressão das proteinoquinases PKA e PKC.

A literatura tem demonstrado, através de diferentes modelos experimentais, que os mediadores inflamatórios TNF- α (NORDAHL; ALSTERGREN e KOPP, 2000), IL-1 β (ALSTERGREN et al., 1998;. KOPP, 1998), prostaglandinas (OMOTE et al., 2002; PORTANOVA et al., 1996) e também NGF (MA e WOOLF, 1997) estão envolvidos no início da hipernocicepção que segue o desafio com o antígeno.

A alta expressão da PKA, demonstrada pelo presente estudo, pode explicar a expressão não significativa da TNF- α na ATM com AR induzida. Tem sido demonstrado que o TNF- α pode ter sua expressão inibida pela PGE₂ através da PKA (STTAFORD E MARNETT, 2008). Estudo anterior demonstrou que a PGE₂ induzida por LPS inibe o TNF- α principalmente ao nível da transcrição de genes (KUNKEL et al., 1988). No entanto, o mecanismo pelo qual a PKA diminui a expressão de RNAm de TNF- α através das PGE₂ ainda é desconhecido (STTAFORD E MARNETT, 2008).

A 15d-PGJ₂ apresenta um potente efeito antinociceptivo e anti-inflamatório na ATM através da coativação dos receptores PPAR- γ e dos receptores opioides kappa e delta através da ativação da via intracelular L-Arginine/NO/cGMP/K⁺_{ATP} (PENADOS-SANTOS et al., 2009). Tendo em vista que esses resultados evidenciam as propriedades farmacológicas da administração periférica da 15d-PGJ₂ nas condições inflamatórias da ATM, neste estudo foi avaliado o efeito periférico da 15d-PGJ₂ na hipernocicepção inflamatória induzida pela AR na ATM. O pré-tratamento com a injeção intra-articular de 15d-PGJ₂ inibiu a hipernocicepção induzida pela AR na ATM de uma maneira dose-dependente, através da redução da expressão da quimiocina KC. Embora as quimiocinas sejam consideradas citocinas (citocinas quimiotáticas), elas pertencem a um grupo específico de citocinas com propriedades químicas e funcionais específicas. Atualmente, com a mudança da nomenclatura, a KC é denominada, desde 2000, por CXCL1, onde suas duas cisteínas possuem um aminoácido entre elas (CXC) e são consideradas como ligantes de quimiocina (L),

possuindo dessa maneira os seus respectivos receptores (R). Estudos mostram que a quimiocina CXCL1 apresenta um importante papel na migração de neutrófilos para a articulação em pacientes com Artrite Reumatoide, sendo que a CXCL1 é responsável por 28% da atividade quimiotática para neutrófilos enquanto que a ação combinada de CXCL1, CXCL5 e CXCL8 é responsável por 50% da atividade quimiotática no fluido sinovial (KOCH et al., 1995). Sendo assim, os resultados sugerem que o tratamento periférico com a 15d-PGJ₂ na ATM com AR induzida, ao reduzir a expressão da KC, tem potencial efeito anti-inflamatório diminuindo a quimiotaxia no local da lesão.

O pré-tratamento com a injeção intra-articular de 15d-PGJ₂ inibiu a hipernocicepção induzida pela AR na ATM de uma maneira dose-dependente também através da redução da expressão da PKA e PKC. As proteinoquinases atuam por uma ampla variedade de sinais indutores de proliferação ou diferenciação, incluindo nos mecanismos de hipernocicepção inflamatória. Tem sido demonstrado que a ativação da PKC participa da sensibilização de fibras nervosas via receptores vaniloides TRPV1 (RUSSEL et al., 2009). A ativação dos receptores valinóides TRPV1 nas fibras periféricas tipo C induzem abertura de canais de Na⁺ e CA⁺² (TOMINAGA e TOMINAGA, 2005; NILIUS et al., 2007), os quais resultam em comportamento nociceptivo. Sendo assim, considerando os resultados do presente estudo é possível que um dos mecanismos analgésicos da 15d-PGJ₂ seja a redução da sensibilização dos canais vaniloides e TTX sódio dependentes induzidos pela ação das proteinoquinases.

7 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo sugerem que a AR induzida experimentalmente na ATM resulta em uma hipernocicepção inflamatória devido ao aumento dos níveis de KC e IL-1 β , e aumento da expressão da PKA e da PKC. O tratamento das ATMs com a 15d-PGJ₂ foi capaz de reduzir o comportamento nociceptivo da AR induzida na ATM. Este efeito antinociceptivo está relacionado, em parte, devido à diminuição dos níveis de KC, da expressão da PKA e da PKC.

Dessa maneira, atingimos nossos objetivos específicos, uma vez que padronizamos o modelo experimental para indução da AR na ATM de ratos; observamos que a AR induzida experimentalmente induz a hipernocicepção inflamatória e que a 15d-PGJ₂ foi capaz de reduzir o comportamento nociceptivo da AR induzida na ATM.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, FV; FRANKLIN KB e CONNELL B. *The stress of a novel environment reduces formalin pain: possible role of serotonin.* Eur J Pharmacol. 1986 Jul 15;126(1-2):141-4.

ABRAMSON, S. B. e AMIN, A. *Blocking the effects of IL-1 in rheumatoid arthritis protects bone and cartilage.* **Rheumatology.** 2002;41:972–980

AKERMAN, S et al. *Relationship between clinical and radiologic findings of the temporomandibular joint in rheumatoid arthritis.* Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1988 Dec;66(6):639-43.

ALEY KO e LEVINE JD. *Role of protein kinase A in the maintenance of inflammatory pain.* **J Neurosci.** 1999,19:2181–2186.

ALSTERGREN, P., et al. *Interleukin-1 in synovial fluid from arthritic temporomandibular joint and its relation to pain, mobility, and anterior open bite.* **J. Oral Maxillofac. Surg.**, 1998, 56, 1059 – 1065.

ARABSHAHI B e CRON RQ. *Temporomandibular joint arthritis in juvenile idiopathic arthritis: the forgotten joint.* Curr Opin Rheumatol. 2006 Sep;18(5):490-5.

ASADA, Kazuhiro et al. *Antiinflammatory Roles of Peroxisome Proliferator-activated Receptor _ in Human Alveolar Macrophages.* **American Journal Of Respiratory And Critical Care Medicine.** 2004, VOL 169.

BAUER, William H. *Osteoarthritis Deformans Of The Temporomandibular Joint.* **American Journal Of Pathology.** 1940, V. XVII

BISHOP-BAILEY, David e HLA, Timothy. *Endothelial Cell Apoptosis Induced by the Peroxisome Proliferator-activated Receptor (PPAR) Ligand 15-Deoxy-D12,14-prostaglandin J2.* **The Journal Of Biological Chemistry.** June, 1999, Vol. 274, No. 24, pp. 17042–17048.

BRAISSANT O, et al. *Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat.* **Endocrinology.** 1996;137:354–366.

BRENNAN, F. M.; FIELD, M.; CHU, C. Q.; FELDMANN, M. & MAINI, R. N. *Cytokine expression in rheumatoid arthritis.* **Br J Rheumatol**, 1991, v. 30, p. 76-80.

BRENNAN, FM e MCINNES,IB. *Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis.* **J. Clin. Invest.** 2008, 118:3537–3545.

BRENOL, Claiton Viegas et al. *Artrite Reumatóide e Aterosclerose.* **Rev Assoc Med Bras** 2007; 53(5): 465-70

CANETTI, CA et al. *IL-18 enhances collagen-induced arthritis by recruiting neutrophils via TNF-alpha and leukotriene B4.* **J Immunol.** 2003 15;171(2):1009-15.

CELIKERL, R, GOKQE-KUTSALL, Y, e ERYILMAZ, M. *Temporomandibular Joint Involvement in Rheumatoid Arthriis. Relationship with Disease Activity.* **Scand J Rheurnatol** 1995; 24: 22-5

CHAWLA A. et al. *PPAR-gamma dependent and independent effects on macrophage-gene expression in lipid metabolism and inflammation.* **Nat Med.** 2001 Jan;7(1):48-52.

CLARK, Robert B et al. *The Nuclear Receptor PPAR γ and Immunoregulation: PPAR γ Mediates Inhibition of Helper T Cell Responses.* **The Journal of Immunology**, 2000, 164: 1364-1371.

COOK, H. P. *Bilateral Ankylosis of the Temporomandibular Joints Following Rheumatoid Arthritis.* **Proc R Soc Med.** 1958 September; 51(9): 694–696.

CUNHA, F. Q. et al. *The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia.* **Br J Pharmacol.** 1992,107(3), 660–664.

CUNHA, F. Q., et al. *Interleukin-8 as a mediator of sympathetic pain.* **Br J Pharmacol.** 1991, 104(3), 765–767.

CUNHA, Suzana C. da et al . Analysis of helkimo and craniomandibular indexes for temporomandibular disorder diagnosis on rheumatoid arthritis patients. *Rev. Bras. Otorrinolaringol.* Feb. 2007 , v. 73, n. 1.

CUNHA, T. M. et al. *A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice.* **PNAS.** February 1, 2005. vol. 102 .no. 5.1755–1760

CUZZOCREA, Salvatore et al. *The cyclopentenone prostaglandin 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2) attenuates the development of acute and chronic inflammation.* **Mol Pharmacol** 2002, 61:997–1007.

DI GIOVINE F. S.; NUKI, G. & DUFF, G. W. *Tumor necrosis factor in synovial exudates.* **Ann Rheum Dis**, 1988, v. 47, p. 768-772.

EVANS AR, VASKO MR, AND NICOL GD. *The cAMP transduction cascade mediates the PGE2-induced inhibition of potassium currents in rat sensory neurones.* **J Physiol.** 1999, 516:163–178.

FELDMAN, M et al. *Anti-tnfa therapy is useful in rheumatoid arthritis and crohn's disease: analysis of the mechanism of action predicts utility in other diseases.* *Transplant Proc.* 1998, v. 30, 4126-4127.

FELDMAN, M.; BRENNAN, F. M. & MAINI, R. N. *Role of cytokines in rheumatoid arthritis.* **Annu Rev Immunol**, 1996, v. 14, p. 397-440.

FERREIRA SH, LORENZETTI BB & POOLE S. *Bradykinin initiates cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia.* **Br J Pharmacol.** 1993b, 110:1227-1231.

FERREIRA, S. H. et al. *Interleukin-1 beta as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue.* **Nature.** 1998, 334(6184), 698–700.

FIRESTEIN, Gary S. *Evolving concepts of rheumatoid arthritis.* *Nature.* 2003, 423, 356-361.

FONTANA, A. et al. *Inerleukin-1 activity in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis.* **Rheumatol Int**, 1982, v. 2, p. 49-53.

FORMAN, BM et al. *15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma.* *Cell.* 1995 Dec 1;83(5):803-12.

FRANKS, A. S. T. *Temporomandibular Joint In Adult Rheumatoid Arthritis. A Comparative Evaluation Of 100 Cases.* **Ann. Rheum. Dis.** 1969, 28, 139

FUNK CD. *Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology.* **Science.** 2001 Nov. 30;294 (5548):1871-5.

GILROY DW. *Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties.* *Nat Med.* 1999 Jun;5(6):698-701.

GOLD MS, LEVINE JD e CORREA AM *Modulation of TTX-R INa by PKC and PKA and their role in PGE2-induced sensitization of rat sensory neurons in vitro.* **J Neurosci.** 1998, 18:10345–10355.

GOUPILLE, P et al. *The temporomandibular joint in rheumatoid arthritis: correlations between clinical and tomographic features.* *J Dent.* 1993 Jun;21(3):141-6.

GRAU, Raquel; IÑIGUEZ, Miguel A. e FRESNO, Manuel. *Inhibition of activator protein 1 activation, vascular endothelial growth factor, and cyclooxygenase-2 expression by 15-deoxy-Delta12, 14-prostaglandin J2 in colon carcinoma cells: evidence for a redox-sensitive peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-independent mechanism.* **Cancer Res.** 2004 Aug 1;64(15):5162-71.

GYNTHER, Göran W. et al. *Temporomandibular joint involvement in generalized osteoarthritis and rheumatoid arthritis: a clinical, arthroscopic, histologic, and immunohistochemical study.* **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.** 1997; 26. 10-16

HAAS DA, et al. *Development of an orofacial model of acute inflammation in the rat.* *Arch Oral Biol.* 1992; 37(5):417-22.

HARRIS, E. D. Jr. *Rheumatoid arthritis. Pathophysiology and implications for therapy.* **N Engl J Med,** 1990, v. 322, p. 1277-1289.

HU, JW. *Response properties of nociceptive and non-nociceptive neurons in the rat's trigeminal subnucleus caudalis (medullary dorsal horn) related to cutaneous and deep craniofacial afferent stimulation and modulation by diffuse noxious inhibitory controls.* *Pain.* 1990 Jun;41(3):331-45.

JIANG C, TING AT e SEED B. *PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines.* *Nature.* 1998 Jan 1;391(6662):82-6.

KAWAHITO, Y. *15-deoxy-delta(12,14)-PGJ(2) induces synoviocyte apoptosis and suppresses adjuvant-induced arthritis in rats.* *J Clin Invest.* 2000 Jul;106(2):189-97.

KHASAR, Sachia G. et al. *A Novel Nociceptor Signaling Pathway Revealed in Protein Kinase C e Mutant Mice.* **Neuron**, 1999, Vol. 24, 253–260.

KIM, Woo Jae, KIM Joon Hyun e JANG, Sung Key. *Anti-inflammatory lipid mediator 15d-PGJ2 inhibits translation through inactivation of eIF4A.* **The EMBO Journal.** 2007, VOL 26, N 24

KOCH AE, et al. *Epithelial neutrophil activating peptide-78: a novel chemotactic cytokine for neutrophils in arthritis.* **J Clin Invest** 1995;94:1012-8.

KOPP, S. *The influence of neuropeptides, serotonin, and interleukin 1 beta on temporomandibular joint pain and inflammation.* **J. Oral Maxillofac. Surg.**, 1998, 56, 189 – 191.

KOPP, Sigvard. *Reduction of Temporomandibular Joint Pain after Treatment with a Combination of Methotrexate and Infl iximab Is Associated with Changes in Synovial Fluid and Plasma Cytokines in Rheumatoid Arthritis.* **Cells Tissues Organs** 2005;180:22–30

KUNKEL SL. et al. *Prostaglandin E2 regulates macrophage-derived tumor necrosis factor gene expression.* **J Biol Chem.** 1988; 263:5380–4.

LEVONEN, Anna-Liisa et al. *Biphasic Effects of 15-Deoxy-_12,14-Prostaglandin J2 on Glutathione Induction and Apoptosis in Human Endothelial Cells.* **Arterioscler Thromb Vasc Bio.** Novembro, 2001

LIN, YC et al. *Temporomandibular joint disorders in patients with rheumatoid arthritis.* **J Chin Med Assoc.** 2007 Dec;70(12):527-34.

LIU HT et al. *The combination of systemic antibiotics and antibiotics impregnated cement in primary total knee arthroplasty in patients of rheumatoid arthritis--evaluation of 60 knees.* *J Chin Med Assoc.* 2003 Sep;66(9):533-6.

LORENZETTI, B. B., et al. *Cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC-1) mediates the sympathetic component of inflammatory mechanical hypersensitivity in rats.* **Eur Cytokine Netw.** 2002, 13(4), 456–461.

- MA, QP e WOOLF, CJ. *The progressive tactile hyperalgesia induced by peripheral inflammation is nerve growth factor dependent*. *Neuroreport*. 1997, Mar;8(4):807-10.
- MARBACH, Joseph J. e SPIERA, Harry. *Rheumatoid Arthritis Of The Temporomandibular Joints*. *Ann. Rheum. Dis*. 1967, 26, 538.
- MARTINS. Wilson Denis. *Artroscopia da articulação Temporomandibular*. *Rev Bras Ortop*. 1993, Vol. 28, Nº 8.
- MCINNES, Iain B et al. *The role of interleukin-15 in T-cell migration and activation in rheumatoid arthritis*. *Nat Med*. 1996, V. 2(2):175-82.
- MCINNES, Iain B. e SCHETT, Georg. *Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis*. *Nature Reviews Immunology*. 2007, v. 7, 429–442.
- MELCHIORRE, D. et al. *A comparison of ultrasonography and magnetic resonance imaging in the evaluation of temporomandibular joint involvement in rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis*. *Rheumatology* 2003;42:673–676.
- MIGITA H e MORSER J. *15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 (15d-PGJ2) signals through retinoic acid receptor-related orphan receptor-alpha but not peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in human vascular endothelial cells: the effect of 15d-PGJ2 on tumor necrosis factor-alpha-induced gene expression*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005 ,25(4):710-6.
- MOTA, Licia Maria Henrique da; LAURINDO, Ieda Maria Magalhães e SANTOS NETO, Leopoldo Luiz dos. *Artrite Reumatoide inicial – conceitos*. *Rev Assoc Med Bras* 2010; 56(2): 227-9
- MUSSO, T et al. *Human monocytes constitutively express membrane-bound, biologically active, and interferon-gamma-upregulated interleukin-15*. *Blood*. 1999 May 15;93(10):3531-9.
- NAPIMOGA, Marcelo H. et al. *15d-Prostaglandin J2 Inhibits Inflammatory Hypernociception: Involvement of Peripheral Opioid Receptor*. *JPET* 2008, 324:313–321.
- NEGISHI M e KATOH H. *Cyclopentenone prostaglandin receptors*. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2002 Aug;68-69:611-7.

NILIUS B, OWSIANIK G, VOETS T, PETERS JA: *Transient receptor potential cation channels in disease*. *Physiol Rev* 2007;87:165-217.

NORDAHL, S. et al. *Radiographic signs of bone destruction in the arthritic temporomandibular joint with special reference to markers of disease activity. A longitudinal study*. **Rheumatology**. 2001; 40; 691-694.

NORDAHL, S., ALSTERGREN, P. & KOPP, S. *Tumour 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.**, 2000, 58, 525 – 530

OMOTE, K., et al. *Effects of a novel selective agonist for prostaglandin receptor subtype EP4 on hyperalgesia and inflammation in monoarthritic model*. **Anesthesiology**, 2002, 97, 170 – 176.

PALMBLAD, Karin et al. *Dynamics of Early Synovial cytokine Expression in Rodent Collagen-Induced arthritis: A Therapeutic Study Using a Macrophage-Deactivating Compound*. **American Journal of Pathology**, 2001, Vol. 158, No. 2.

PENA-DOS-SANTOS, D.R. et al. *Activation of peripheral kappa/delta opioid receptors mediates 15-deoxy-(Delta 12, 14)-prostaglandin J2 induced-antinociception in rat temporomandibular joint*. *Neuroscience*. 2009 Nov 10;163(4):1211-9.

PEREIRA, Ivânio Alves. *Artrite Reumatóide*. **Arquivos Catarinenses de Medicina** 2007, Vol. 36, no. 3.

PHULWANI, Nirmal K. et al. *15-deoxy-D12, 14-prostaglandin J2 (15d-PGJ2) and ciglitazone modulate Staphylococcus aureus-dependent astrocyte activation primarily through a PPAR-c-independent pathway*. **Journal of Neurochemistry**, 2006, 99, 1389–1402

PORTANOVA, J.P. et al. *Selective neutralization of prostaglandin E2 blocks inflammation, hyperalgesia, and interleukin 6 production in vivo*. **J. Exp. Med.**, 1996, 184, 883 – 891.

RICOTE, M et al. *Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) in human atherosclerosis and regulation in macrophages by colony stimulating factors and oxidized low density lipoprotein*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 1998, v. 95, pp. 7614–7619.

RICOTE, M et al. *The peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) as a regulator of monocyte/macrophage function.* **J. Leukocyte Biol.** 1999; 66:733-739

RICOTE, M et al. *The peroxisome proliferator-activated receptor- γ is a negative regulator of macrophage activation.* **Nature** 1998, 391, 79-82.

ROSLAND, JH. *The formalin test in mice: the influence of ambient temperature.* **Pain.** 1991 May;45(2):211-6.

ROVERONI, RC et al. *Development of a behavioral model of TMJ pain in rats: the TMJ formalin test.* **Pain.** 2001 Nov;94(2):185-91.

RUBBERT-ROTH, Andrea e FINCKH, Axel. *Treatment options in patients with rheumatoid arthritis failing initial TNF inhibitor therapy: a critical review.* **Arthritis Research & Therapy.** Vol 11. Suppl 1.

RUSSELL, F.A. et al. *Proteinase-activated receptor-4 (PAR4) activation leads to sensitization of rat joint primary afferents via a bradykinin B2 receptor-dependent mechanism.* **J. Neurophysiol.** 2009, 103, 155–163.

SÁNCHEZ-GÓMEZ, Francisco J. et al. *Protein Thiol Modification by 15-deoxy- Δ -12,14-Prostaglandin J2 Addition in Mesangial Cells: Role in the Inhibition of Pro-inflammatory Genes.* **Mol Pharmacol** 2004, 66:1349–1358.

SCHER JU e PILLINGER MH. *15d-PGJ2: the anti-inflammatory prostaglandin?* **Clin Immunol.** 2005 Feb;114(2):100-9.

SHAN, ZZ. *A potential role of 15-deoxy- Δ (12,14)-prostaglandin J2 for induction of human articular chondrocyte apoptosis in arthritis.* **J Biol Chem.** 2004 Sep 3;279(36):37939-50.

SILVA, Raíssa G. et al. *Artrite Reumatóide.* - **Rev. Bras. Med.** – 2003, v. 60 - Nº 8.

SMITH HJ, LARHEIM TA, ASPESTRAND F. *Rheumatic and nonrheumatic disease in the temporomandibular joint: gadolinium-enhanced MR imaging.* **Radiology.** 1992 Oct;185(1):229-34.

STAFFORD, Jennifer B e MARNETT, Lawrence J. *Prostaglandin E₂ Inhibits Tumor Necrosis Factor*

THIERINGER, R. et al. *Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma does not inhibit IL-6 or TNF-alpha responses of macrophages to lipopolysaccharide in vitro or in vivo.* **J Immunol.** 2000 Jan 15;164(2):1046-54.

THURKOW, Erik W. et al. *Increased expression of il-15 in the synovium of patients with rheumatoid arthritis compared with patients with yersinia-induced arthritis and osteoarthritis.* **Journal of Pathology**, 1997, v. 181: 444–450.

TOMINAGA M, TOMINAGA T: *Structure and function of TRPV1.* Pflugers Arch 2005;451:143-150

TWILT, M et al. *Long-Term Followup of Temporomandibular Joint Involvement in Juvenile Idiopathic Arthritis.* **Arthritis & Rheumatism (Arthritis Care & Research)** 2008, Vol. 59, No. 4, April 15, pp 546–552

VERRI, Waldiceu A. et al. *Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: Targets for analgesic drug development?* **Pharmacology & Therapeutics.** 2006, 112 ,116–138.

VOOG U. et al. *Impact of temporomandibular joint pain on activities of daily living in patients with rheumatoid arthritis.* Acta Odontol Scand. 2003 Oct;61(5):278-82.

WILLOUGHBY, Derek A; MOORE, Adrian R. e COLVILLE-NASH, Paul R. *Cyclopentenone prostaglandins: new allies in the war on inflammation.* **Nature Medicine.** 2000, v. 6, 137 – 138.

YEUN OH, Joo.et al. *Accumulation of 15-deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J2 adduct formation with Keap1 over time: effects on potency for intracellular antioxidant defence Induction.* **Biochem. J.** (2008) 411, 297–306

YOKOYAMA, Kozo e OKU, Takeshi. *Rheumatoid arthritis affected temporomandibular joint pain analgesia by linear polarized near infrared irradiation.* **Can J Anesth** 1999. 46: 7 . p 683-687.

YOSHIDA A. *Range of motion of the temporomandibular joint in rheumatoid arthritis: relationship to the severity of disease.* Cranio. 1998 Jul;16(3):162-7.

ZHANG X. et al. A. *Differential regulation of chemokine gene expression by 15-deoxy-d12,14 prostaglandin J2.* **J. Immunol.** 2001, 166, 7104–7111.

ZHU Y. et al. *Structural organization of mouse peroxisome proliferator-activated receptor gamma (mPPAR gamma) gene: alternative promoter use and different splicing yield two mPPAR gamma isoforms.* **Proc Natl Acad Sci U S A.** 1995 Aug 15;92(17):7921-5.

ZIMMERMANN, M. *Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals.* **Pain** 1983, 16:109–110.

ZINGARELLI, Basilia et al. *Peroxisome Proliferator Activator Receptor- γ Ligands, 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J_2 and Ciglitazone, Reduce Systemic Inflammation in Polymicrobial Sepsis by Modulation of Signal Transduction Pathways.* **The Journal of Immunology**, 2003, 171: 6827-6837.

Anexo I – Aprovação do Comitê de Ética



Comitê de Ética em Experimentação Animal

Ofício CEEA-072/2009

Uberaba, 19 de junho de 2009

Ilma. Prof^a.

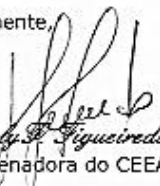
Juliana Trindade Clemente Napimoga

Assunto: Encaminha parecer nº 059/2009, sobre o protocolo de pesquisa *"Avaliação do efeito periférico da 15d-PGJ2 na artrite reumatóide induzida experimentalmente na articulação temporomandibular de ratos"* – Processo 059/2009.

Prezada Senhora.

Em resposta a sua solicitação, informo que o protocolo acima referido foi submetido à avaliação do CEEA-UNIUBE na reunião do dia 19/06/2009, sendo **aprovado**.

Atenciosamente,


Prof. Josely F. Figueiredo Billar
Vice-Coordenadora do CEEA-UNIUBE