

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO
FARMACOLOGIA**

**PADRONIZAÇÃO DE MODELO EXPERIMENTAL DE ARTRITE NA
ARTICULAÇÃO TEMPOROMANDIBULAR INDUZIDA POR ZYMOSAN
EM RATOS E ESTUDO DO PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO**

HELLÍADA VASCONCELOS CHAVES

ORIENTADORA: PROF^a DR^a GERLY ANNE DE CASTRO BRITO

Fortaleza - Ceará - Brasil

Julho/2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Hellíada Vasconcelos Chaves

**PADRONIZAÇÃO DE MODELO EXPERIMENTAL DE ARTRITE NA
ARTICULAÇÃO TEMPOROMANDIBULAR INDUZIDA POR ZYMOSAN EM RATOS
E ESTUDO DO PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador:

Prof^a Dr^a Gerly Anne de Castro Brito

Fortaleza – Ceará – Brasil

Julho– 2006

C438p Chaves, Hellíada Vasconcelos
Padronização de modelo experimental de artrite na
articulação temporomandibular induzida por zymosan
em ratos e estudo do papel do óxido nítrico/ Hellíada
Vasconcelos Chaves.- Fortaleza, 2006.
123 f.: il

Orientador: Prof^a Dr^a Gerly Anne de Castro Brito.
Dissertação (Mestrado). Universidade Federal
do Ceará. Faculdade de Medicina.

1. Articulação temporomandibular 2. Artrite
experimental 3. Óxido nítrico 4. Zymosan 5. Síndrome
de disfunção da articulação temporomandibular

CDD 616.722

**PADRONIZAÇÃO DE MODELO EXPERIMENTAL DE ARTRITE NA
ARTICULAÇÃO TEMPOROMANDIBULAR INDUZIDA POR ZYMOBAN EM RATOS
E ESTUDO DO PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO**

Esta dissertação foi submetida como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Farmacologia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca de Ciências da Saúde da referida Universidade.

A citação de qualquer texto desta Dissertação é permitida, desde que seja feita em conformidade com as normas de ética.

Dissertação aprovada com louvor em: 11 / 07 / 2006

BANCA EXAMINADORA

**Profª Drª Gerly Anne de Castro Brito
(Orientadora)**

Prof Dr Francisco Airton de Castro Rocha

Prof Dr Henrique Clasen Scarparo

T

Trabalho realizado no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer
(LAFICA)

Departamento de Fisiologia e Farmacologia
Faculdade de Medicina – Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

Disseram-me uma vez que a vida que temos não é nossa - ela nos é emprestada para dela fazermos o melhor. E é mesmo por isso que me é tão natural agradecer - inicialmente a Deus, por ter me colocado em uma vida tão simples de se gerenciar, cheia de amor e de luz. Luz esta que sempre me ajudou a ver os melhores caminhos, nem sempre os mais fáceis.

Muito especialmente à minha orientadora, Prof^a Gerly Anne de Castro Brito: pela perene paciência e apoio; pelo exemplo de divisão perfeita entre a ciência e o amor à família, pelo modelo de pesquisadora, e; por ser tão indispensável, seja para a realização deste trabalho, seja para minha formação pessoal e científica.

Ao professor Ronaldo de Albuquerque Ribeiro, que sempre me fez sentir segura, desde remotos tempos, em sua acolhida no laboratório, na orientação em iniciação científica e na lição de dedicação e trabalho.

Ao professor Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza, que esteve presente em alguns momentos de dificuldade, tranquilizando-me.

À professora e amiga Mariana, importante e certa presença ao longo de todo o mestrado.

Aos professores e amigos de trabalho Marcus Aurélio Rabelo Lima Verde e Antônio Materson Silva, pelo confiável refrigério e paradigma do que é ser mestre.

Aos demais professores do Curso de Odontologia, emblema de saber e apanágio do conhecimento.

Aos estagiários de iniciação científica André Mattos, Analis Rodrigues e Aline Kércia, participação indispensável neste trabalho.

À Antoniella, pela amizade, presença contínua e disposição para ajudar.

Às amigas Vilma e Renata, pelo sincero afeto e carinho, com quem compartilho, além de discussões científicas, sonhos e aflições.

Aos amigos do LAFICA: Roberta Dalcico, Rosymeire (Rosinha), Pedro, Marco Botelho, Rosane, Lorena, Adriana, Regina, Romualdo, Yuri, Maurício, Caio, Camila, Mirlane, Raphael Capaz e Prof. Paulo, pela cooperação e convivência no laboratório.

À Maria Silvandira França Pinheiro, Vandinha, pelo reiterado carinho e apoio.

Ao Ivan, pela amizade, sinceridade e disposição incansáveis.

A todos os professores Departamento de Fisiologia e Farmacologia, pela formação que me legaram.

A todos os colegas do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, pelo companheirismo - em especial, Palheta, Virgínia, Ana Carolina, Rondinele e Juliana Lemos.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, pelo apoio sempre que necessário - especialmente à Aura, ao Haroldo e à Rose.

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

À minha mãe Fátima, uma mulher guerreira, em quem me espelho para ser uma pessoa melhor, mais humana e mais profissional.

Ao meu pai Paulo de Tarso Pardal, de quem herdei o dom e com quem aprendi a beleza de ser professor.

À minha irmã Raíssa, amiga verdadeira, irmã dedicada, mulher admirável, pelo amor e apoio.

A meu irmãozinho Samuel que, mesmo não entendendo a importância desse trabalho, em seu 1 (um) ano e 4 (quatro) meses de idade, complementa minha felicidade.

Ao Haroldo, meu namorado, amigo e confidente, pelo lindo amor que me dedica, pelo incondicional alento, por me tornar uma pessoa mais feliz e por acreditar em meus e em nossos sonhos.

À minha família, em especial a meus tios Maísa, Amauri, Mairla, Sílvia, Odilardo e Neuma, e a meus avós Almira e Evangelista, Terezinha e Aprígio, por sempre acreditarem na minha dedicação e nos frutos dela colhidos.

Aos velhos amigos que adornam minha vida, um muito obrigada amoroso: Andréa, Alessandra, Giovanna, Jacqueline, Monalisa, Ianna, Ianne, Mirella, Ysmênia, Fábio Wildson, Marco Aurélio Nazareth, Fernando Endo e Natércia, pela torcida dentro e fora dos limites da faculdade.

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

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas	iv
Lista de Figuras	vii
Lista de Tabelas	ix
Resumo	x
Abstract	xi

I. INTRODUÇÃO

1. Articulação temporomandibular	2
2. Disfunção temporomandibular	5
3. Modelos experimentais para estudo das alterações inflamatórias na articulação temporomandibular	7
4. Artrite induzida por zymosan	9
5. Mediadores inflamatórios na disfunção temporomandibular	9
5.1. Citocinas	10
5.1.1. Interleucina-1	10
5.1.2. Fator de necrose tumoral alfa	12
5.1.3. Interleucina-6	13
5.1.4. Interleucina-8	14
5.2. Serotonina	14
5.3. Neuropeptídeos	15
5.4. Derivados do ácido araquidônico	16
6. Óxido nítrico	17
6.1. Biossíntese	17
6.2. Ações do óxido nítrico	18
6.3. Óxido nítrico e artrite	19
6.4. Óxido nítrico e disfunção temporomandibular	20

II. OBJETIVOS

1. Objetivos gerais	24
2. Objetivos específicos	24

III. MATERIAL E MÉTODOS

1. Animais	26
2. Drogas, Soluções, Líquidos e Corantes	26
3. Protocolo experimental	27
3.1. Descrição do modelo experimental - Indução da artrite na ATM por zymosan	27
3.2. Estudo da dose-resposta	28
3.3. Estudo da cinética do influxo celular no líquido sinovial	28
3.4. Parâmetros avaliados	28
3.4.1. Contagem do influxo celular no líquido sinovial	28
3.4.2. Medida do extravasamento de azul de Evans / Análise da permeabilidade vascular	29
3.4.3. Ensaio de mieloperoxidase	29
3.4.4. Dosagem de nitrito – determinação da produção de óxido nítrico	30
3.4.5. Análise histopatológica da ATM	31
3.4.6. Estudo da reação de imunohistoquímica para NOSi	31
4. Modulação farmacológica.....	32
4.1. Inibidores da síntese de óxido nítrico	33
5. Análise estatística	33

IV. RESULTADOS

1. Modelo experimental de artrite na ATM induzida por zymosan em ratos	35
--	----

1.1. Estudo da dose-resposta	35
1.2. Estudo da cinética do influxo celular no líquido sinovial	35
1.3. Estudo do extravasamento de azul de Evans / Análise da permeabilidade vascular	38
1.4. Estudo da atividade de mieloperoxidase	38
1.5. Estudo da dosagem de nitrito/nitrato – determinação da produção de óxido nítrico.....	38
1.6. Análise histopatológica da ATM	42
1.7. Estudo da reação de imunohistoquímica para NOSi	51
2. Efeito da administração de inibidores da síntese de óxido nítrico	54
2.1. Efeito do L-NAME e do 1400W sobre o influxo celular no líquido sinovial .	54
2.2. Efeito do L-NAME e do 1400W sobre extravasamento de azul de Evans / Análise da permeabilidade vascular	54
2.3. Efeito do L-NAME e do 1400W sobre análise histopatológica	58
2.4. Efeito do L-NAME e do 1400W sobre estudo da reação de imunohistoquímica para NOSi	58
V. DISCUSSÃO	64
VI. CONCLUSÕES	75
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
ANEXO	105

LISTA DE ABREVIATURAS

1400W: N-((3-(aminnoetil) fenil) metil) etanimidamida

5-HT: 5-hidroxitriptamina

°C: graus Celsius

ANOVA: análise de variância

CFA: adjuvante completo de Freund

CGRP: peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

COX: cicloxigenase

d: dia (s)

DAB: 3,3`diaminobenzidine

e.p.m.: erro padrão da média

E: esquerda

g: grama

G: gauge

GMPc: guanilato monofosfato cíclico

h: hora (s)

HE: hematoxilina-eosina

Ig: imunoglobulina

IL-1ra: antagonista do receptor de IL-1

IL-1: Interleucina 1

IL-6: interleucina-6

IL-1 α : Interleucina-1 alfa

IL-1 β : Interleucina-1 beta

IL-8: interleucina-8

i.art.: intra-articular

i.p.: intraperitoneal

i.v.: intra-vascular

KCl: cloreto de potássio

KH₂PO₄: fosfato ácido de potássio

kg: quilograma

L: litro

L-NIL: N-iminoetil-L-lisina

LTB₄: leucotrieno B₄
L-NAME: L-N^G –nitroarginina metil éster
L-NMMA: N^G-monometil-L-arginina
LPS: lipolissacarídeo de parede bacteriana
mg: miligrama
min: minuto (s)
mL: mililitro
NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo
NANC: sistema não-adrenérgico não-colinérgico
NaCl: cloreto de sódio
NEED: N-1 naftil-etilenodiamino
NGF: fator de crescimento neuronal
NKA: neurocinina A
nm: nanômetro
NO: óxido nítrico
NO₂⁻: nitrito
NO₃⁻: nitrato
NOS: óxido nítrico sintase
NOS_c: óxido nítrico sintase constitutiva
NOS_e: óxido nítrico sintase endotelial
NOS_i: óxido nítrico sintase induzida
NOS_n: óxido nítrico sintase neuronal
NPS: nitroprussiato de sódio
NPY: neuropeptídeo Y
NT: não-tratado
p: probabilidade
PBS: tampão fosfato
PBS-BSA: albumina sérica bovina
PG: prostaglandina
PGE₂: prostaglandina E₂
PMN: leucócito polimorfonuclear
PRGC: peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
q.s.p: quantidade suficiente para
r.p.m.: rotação por minuto

s: segundo (s)

s.c.: subcutânea

sIL-1RII: forma solúvel do receptor de IL-1 tipo II

sTNFR-I: forma solúvel do receptor de TNF α tipo I

sTNFR-II: forma solúvel do receptor de TNF α tipo II

SIN-1: S-morfolinosidnoimina

SP: substância P

TM: Tricrômio de Mallory

TNF: fator de necrose tumoral

Zy: zymosan

μ g: micrograma

μ l: microlitro

μ m: micrômetro

μ mol: micromolar

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Articulação temporomandibular e músculos mastigatórios.

Figura 2. Curva dose-resposta da migração de leucócitos totais no líquido sinovial da ATM de ratos induzida por zymosan (Zy).

Figura 3. Cinética da migração leucocitária da artrite na ATM de ratos induzida por zymosan (Zy).

Figura 4. Estudo do extravasamento de azul de Evans / análise da permeabilidade vascular da artrite na ATM em ratos induzida por zymosan (Zy).

Figura 5. Estudo da atividade de mieloperoxidase na artrite da ATM de ratos induzida por zymosan (Zy).

Figura 6. Estudo da dosagem de nitrito/nitrato – determinação da produção de óxido nítrico da artrite na ATM de ratos induzida por zymosan (Zy).

Figura 7. Fotomicrografias de ATMs de ratos normais, de animais submetidos à artrite por Zy agudo (6 h) e crônico (10 e 21 d) obtidos através da coloração pelo método hematoxilina-eosina (HE).

Figura 8. Fotomicrografias da membrana sinovial da ATM de ratos normais, de animais submetidos à artrite por Zy agudo (6 h) e crônico (10 e 21 d) obtidos através da coloração pelo método hematoxilina-eosina (HE).

Figura 9. Fotomicrografias de ATMs de ratos normais, de animais submetidos à artrite por Zy agudo (6 h) e crônico (10 e 21 d) obtidos através da coloração pelo método tricrômio de Mallory (TM).

Figura 10. Fotomicrografias de ATMs de ratos normais e de animais submetidos à artrite por zymosan (Zy) agudo (6 h) obtidas após reação de imunohistoquímica para NOSi.

Figura 11. Efeito da administração de L-NAME sobre influxo celular no líquido sinovial na artrite da ATM de ratos induzida por zymosan (Zy).

Figura 12. Efeito da administração de 1400 W sobre influxo celular no líquido sinovial na artrite da ATM de ratos induzida por zymosan (Zy).

Figura 13. Efeito da administração de L-NAME e de 1400 W sobre concentração de Azul de Evans na artrite da ATM de ratos induzida por zymosan (Zy).

Figura 14. Fotomicrografias de ATMs de ratos normais, de animais submetidos à artrite aguda por zymosan (Zy) (6 h) e com administração de L-NAME e de 1400W obtidos através da coloração pelo método hematoxilina-eosina (HE).

Figura 15. Fotomicrografias de ATMs de ratos submetidos à artrite aguda por zymosan (Zy) (6 h) e com administração de L-NAME e de 1400W obtidas pela reação de imunohistoquímica para NOSi.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Análise histopatológica da artrite na ATM de ratos induzida por zymosan através da coloração pelo método hematoxilina-eosina (HE).

Tabela 2. Análise histopatológica da artrite na ATM de ratos induzida por zymosan através da coloração pelo método tricrômio de Mallory (TM).

Tabela 3. Efeito da administração de L-NAME e de 1400W sobre análise histopatológica da artrite na ATM de ratos induzida por zymosan através da coloração pelo método hematoxilina-eosina (HE).

RESUMO

Disfunção temporomandibular (DTM) é um distúrbio relacionado à função do sistema mastigatório que acomete as articulações temporomandibulares (ATM), os músculos mastigatórios e/ou estruturas associadas. As desordens inflamatórias na ATM classificam-se como uma das quatro classes de DTM, estando presente em um grande número de pacientes. Embora a inflamação e a dor nas estruturas articulares sejam entidades clínicas importantes, seus mecanismos são pouco compreendidos. Objetivamos montar modelo experimental de artrite na ATM para estudar a fisiopatologia da doença e a participação de mediadores inflamatórios como óxido nítrico (NO). Foram utilizados ratos Wistar fêmeas (160-220 g) nos quais se injetou 40 microlitros de zymosan (Zy: 0,25; 0,5; 1 ou 2 mg) na ATM esquerda dos animais para indução de artrite. Esses animais foram sacrificados nos tempos de 3 h, 6 h, 1, 2, 3, 5, 7, 10 e 21 dias. Utilizaram-se inibidores da síntese de óxido nítrico L-NAME (10, 30 e 100 mg/kg i.p.) ou 1400W (0,5 e 1 mg/kg s.c.) os quais foram injetados 30 min antes da indução da artrite. Parâmetros de contagem do influxo celular no líquido sinovial, estudo da permeabilidade vascular pelo extravasamento de azul de Evans, estudo do ensaio de mieloperoxidase (MPO), determinação da produção de óxido nítrico através da dosagem de nitrito pelo método de Griess, análise histopatológica e imunohistoquímica para NO sintase induzida (NOSi) foram avaliados. Observamos que Zy (2 mg) induziu aumento significativo do influxo celular no líquido sinovial ($p < 0,05$), do extravasamento de azul de Evans ($p < 0,05$), da atividade de mieloperoxidase ($p < 0,05$) e da dosagem de nitrito/nitrato ($p < 0,05$) na 6ª h após indução da artrite em relação ao grupo controle. A análise histopatológica mostrou que Zy (2 mg) induziu, de forma significativa, infiltrado celular na membrana sinovial, no tecido conjuntivo periarticular, no tecido muscular esquelético e espessamento da MS na 6ª h após indução da artrite. No 10º d após indução da artrite, continua a apresentar infiltrado celular na MS, no tecido conjuntivo periarticular, no tecido muscular esquelético e espessamento da MS, assim como passa a apresentar fibrose da MS e do disco articular. No 21º dia após indução da artrite, foram observados infiltrado celular apenas na MS, com espessamento da mesma, e aumento da fibrose da membrana sinovial, da cartilagem articular, do tecido periarticular e do disco articular, significativamente diferentes em relação ao grupo controle. À análise da reação de imunohistoquímica para NOSi, observou-se aumento da expressão de NOSi no animais com Zy (2 mg). Tanto L-NAME 100 mg/kg quanto 1400W 1 mg/kg ($p < 0,05$) foram capazes de reverter o aumento do influxo celular no líquido sinovial da ATM ($p < 0,05$), o extravasamento plasmático ($p < 0,05$), as alterações histopatológicas e a expressão de NOSi pelo estudo da reação de imunohistoquímica para NOSi observadas na 6ª h após indução da artrite. Esses resultados sugerem que o modelo experimental proposto se presta ao estudo da artrite na ATM, e que NO participa na fisiopatologia do processo inflamatório da DTM.

ABSTRACT

Temporomandibular dysfunction (TMD) is related to a masticatory system dysfunction which can include the temporomandibular joint (TMJ), the masticatory muscles and/or other related structures. TMJ inflammatory disorders are one of the major pathology of TMD affecting a great number of patients. Although TMJ's inflammation and pain are important clinical entities, their mechanisms are poorly understood. The purpose of the study is to propose an experimental model of TMJ's arthritis to study its pathophysiological mechanisms and inflammatory mediators such as nitric oxide (NO). Female Wistar rats (160-220 g) were used to the study. To induce TMJ's arthritis, zymosan 40 μ L (Zy: 0,25; 0,5; 1 ou 2 mg) was injected into left TMJ. The animals were sacrificed in times 3 h, 6 h, 1, 2, 3, 5, 7, 10 e 21 days. Nitric oxide synthase inhibitors L-NAME (10, 30 e 100 mg/kg i.p.) or 1400W (0,5 e 1 mg/kg s.c.) were administered 30 min before TMJ's arthritis induction. Leucocyte influx count in the synovial fluid, vascular permeability study using Evans blue dye extravasation, myeloperoxidase assay (MPO), NO production determination using Griess reaction, histopathological analysis and immunohistochemical for induced NO synthase (iNOS) were utilized as parameters of this study. It was observed that Zy (2 mg) induced significantly increase in leucocyte influx count ($p < 0,05$), Evans blue dye's extravasation ($p < 0,05$), myeloperoxidase activity ($p < 0,05$) and NO dosage ($p < 0,05$) compared with control group 6 h after TMJ arthritis induction. Histopathological analysis of TMJ of Zy injected animals showed inflammatory cell infiltration in synovial membrane (SM), in connective periarticular tissue, in skeletal muscle tissue and thickness of SM in 6 h after TMJ arthritis. On the 10th day after TMJ arthritis, the TMJ remain showing leucocyte infiltration to synovial membrane (SM), to connective periarticular tissue, to skeletal muscle tissue and thickness of SM, as well as fibrosis of SM and articular disc. On the 21st d after TMJ arthritis, it was observed cell influx only to SM, showing, however, thickness of SM and the major fibrosis of SM, articular cartilage, connective periarticular tissue and articular disc. TMJ's immunohistochemistry reaction for iNOS showed increase iNOS's expression in animals with TMJ's arthritis compared to the control group. L-NAME 100 mg/kg and 1400W 1 mg/kg reduced the increase in leucocyte count in the synovial fluid, the Evans blue dye extravasation, the histopathological alterations, and reduced the iNOS expression after immunohistochemistry reaction for iNOS 6 h after TMJ arthritis. These results suggest that this experimental model can be used to study TMJ arthritis, and that NO can participate in the physiopathological mechanisms of TMD.

I. INTRODUÇÃO

I. INTRODUÇÃO

1. Articulação temporomandibular

As articulações temporomandibulares (ATM) são componentes do sistema estomatognático constituído também pela musculatura facial, dentes, periodonto, mucosa jugal, língua, glândulas, nervos e vasos sanguíneos. Esses componentes, em conjunto, desempenham importantes funções para a sobrevivência e para as relações sociais dos indivíduos como mastigação, sucção, deglutição, respiração, fala e expressão facial. Caso alguma dessas estruturas esteja acometida funcional ou patologicamente, tal alteração trará problemas funcionais e prejudicará sobremaneira a qualidade de vida dessas pessoas (PAIVA, 1997).

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

Está localizada à frente do ouvido e é formada anatomicamente pelo côndilo mandibular articulando na fossa mandibular do osso temporal, apresentando o disco articular, avascular e sem inervação, interposto entre as duas estruturas ósseas com as funções de amortecer e distribuir pressões durante os movimentos; preencher os espaços intra-articulares, compensando as irregularidades ósseas; estabilizar os côndilos nas suas posições e movimentos funcionais e proteger a cartilagem articular e o osso subcondral. O disco articular é constituído por uma matriz

fundamental composta de fibras colágenas e proteoglicanos com condrócitos em sua intimidade. Insere-se na cápsula articular anterior e posteriormente, sendo a região posterior denominada zona bilaminar ou retrodiscal. Essa região apresenta dois estratos, o superior, composto de fibras elásticas, e o inferior, composto de fibras colágenas, sendo a única estrutura capaz de tracionar posteriormente o disco articular, caracterizando-se por ser ricamente inervada e vascularizada e, portanto, fonte importante de dor nas disfunções temporomandibulares (DTM) (FUJITA & HOSHINO, 1989; OKESON, 2000) (figura 1).

Os ligamentos articulares como cápsula articular, ligamento temporomandibular, ligamentos colaterais mediais e laterais e ligamento mandíbulo ou disco-maleolar, participam da função articular ao limitar de forma passiva os movimentos excursivos mandibulares tanto mecanicamente quanto através de atividades reflexas neuromusculares (OKESON, 2000).

A presença do líquido sinovial, produzido, secretado e reabsorvido pela membrana sinovial situada na superfície interna da cápsula articular, é muito importante, pois lubrifica as superfícies articulares, nutre as células do disco articular e da cartilagem articular e atua na defesa local ao apresentar células como linfócitos e macrófagos. O revestimento da membrana sinovial é composto de uma a três camadas de células sinoviais (sinoviócitos tipo A ou macrófagos-símile e sinoviócitos tipo B ou fibroblastos-símile) soltas em uma matriz fundamental composta de proteoglicanos, tendo as glicosaminoglicanas (condroitin-4-sulfato e condroitin-6-sulfato) como seus componentes estruturais, de ácido hialurônico, de água e de fibras colágenas. Não apresenta membrana basal para separação do tecido conjuntivo subjacente, apenas uma estrutura símile (laminina), e o epitélio dos capilares são fenestrados (DIJKGRAAF *et al.*, 1995; MURAMAKI *et al.*, 1998; SHIBATA *et al.*, 1998, NOZAWA-INOUE *et al.*, 2003).

O equilíbrio entre os níveis das enzimas metaloproteinases (MMPs), que degradam proteoglicano e colágeno da matriz cartilaginosa, e TIMPs, fator tecidual inibidor das metaloproteinases, regulam a remodelação tecidual em condições fisiológicas. O desequilíbrio entre os níveis dessas enzimas é um fator importante para o desenvolvimento de processos degenerativos articulares (LEONORE *et al.*, 1995; KUBOTA *et al.*, 1997,1998; SHINODA & TAKAKU, 2000; MIZUI *et al.*, 2001).

Anatomia da ATM

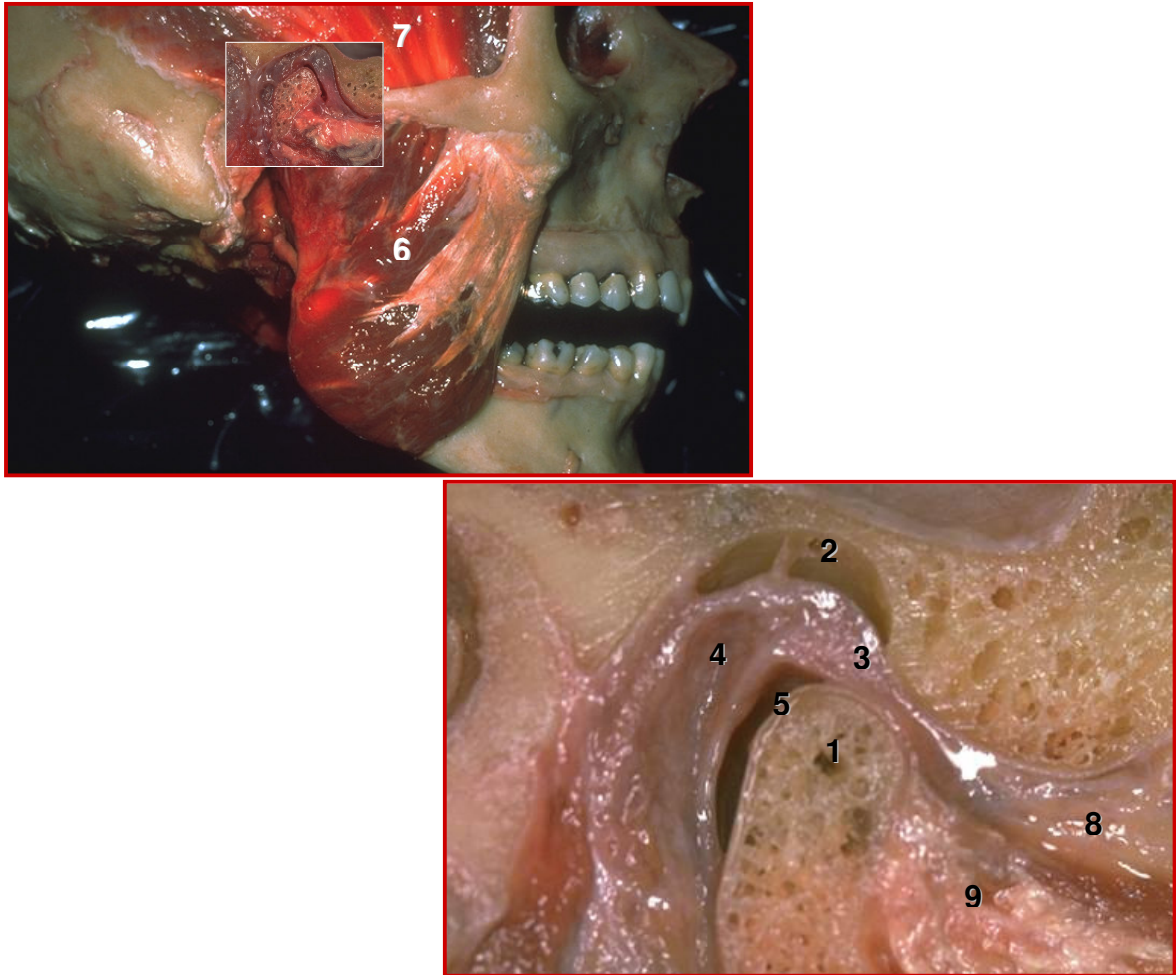


Figura 1. Articulação temporomandibular e músculos mastigatórios. 1. côndilo mandibular, 2. fossa mandibular do osso temporal, 3. disco articular, 4. zona retrodiscal, 5. cartilagem articular, 6. músculo masseter, 7. músculo temporal, 8. músculo pterigóideo lateral superior, 9. músculo pterigóideo lateral inferior.

2. Disfunção temporomandibular

Disfunção temporomandibular (DTM) é um distúrbio relacionado à função do sistema mastigatório que acomete as articulações temporomandibulares e/ou os músculos mastigatórios caracterizada por ruídos articulares, limitação dos movimentos mandibulares e dores orofaciais, alterando sobremaneira a qualidade de vida desses pacientes, levando-os ao afastamento no trabalho e a ter problemas familiares e sociais. Inicialmente foi denominada Síndrome de Costen em 1934, identificada por um otorrinolaringologista, ao descrever um grupo de sintomas situados ao redor do ouvido e nas ATMs, sendo denominada DTM em 1982 (COSTEN, 1934; LOCKER & GRUSHKA, 1987; OKESON, 2000).

Dados epidemiológicos, indisponíveis no Brasil, sugerem que cerca de 6 a 12% da população apresentam sintomas de DTM e que são gastos por ano cerca de 10 bilhões de dólares no tratamento desta desordem nos Estados Unidos. Dados mostraram também uma maior prevalência de DTM no sexo feminino (WÄNMAN, 1996; KIRVESKARI *et al.*, 1998; KAMISAKA *et al.*, 2000; MILAM, 2003).

As DTMs apresentam etiologia multifatorial tendo como fatores de risco hábitos parafuncionais como mascar chicletes, onicofagia, hábito de morder objetos e bruxismo (ISRAEL *et al.*, 1999; MANFREDINI *et al.*, 2003). Hábitos posturais como maneira de sentar, de andar, posição de dormir e uso de bolsas pesadas, e hábitos ocupacionais como o uso contínuo do telefone por telefonistas e músicos com instrumento de sopro ou instrumento com apoio na mandíbula também são importantes (de WIJER *et al.*, 1996; OLIVO *et al.*, 2006). Traumas na região de face e pescoço são fatores de risco importantes (HARKINS & MARTENEY, 1985; KRONN, 1993). Problemas psicológicos, ansiedade, depressão e estresse têm grande correlação com os pacientes que apresentam DTM (SCHNURR *et al.*, 1990; MADLAND *et al.*, 2000). Envolvimento de alterações sistêmicas como artrite reumatóide e fibromialgia são importantes de serem investigados durante anamnese desses pacientes (CHENITZ, 1992; FREDRIKSON *et al.*, 2003; SMYTHE, 2005).

Dor nas estruturas articulares e musculares é um dos mais importantes sintomas de pacientes com DTM e uma fonte comum de dor orofacial crônica. Trabalhos têm relatado que a inflamação articular exerce o papel de sensibilizar nociceptores, causando hiperalgesia, e aumenta a excitabilidade dos neurônios do

gânglio trigeminal que inervam a ATM, causando alodínea. A dor articular pode, ainda, causar hiperatividade dos músculos mastigatórios, o que perpetua a condição da dor facial (Yu *et al.*, 1995; TAKEUCHI *et al.*, 2004; TAKEDA *et al.*, 2006). Outros sintomas característicos de DTM são limitação e dor durante movimentos mandibulares e ruídos articulares durante movimento como estalido e crepitação. Sintomas não característicos de DTM como cefaléia, dor cervical, sintomas otológicos como zumbido, otalgia, perda de audição e barohipoacusia e distúrbios do sono podem estar presentes em alguns casos (KAMISAKA *et al.*, 2000; CIANCAGLINI & RADELLI, 2001; LAM *et al.*, 2001; YATANI *et al.*, 2002; OLIVO *et al.*, 2006).

As DTMs podem ser classificadas em articulares e musculares. As disfunções musculares incluem co-contração protetora, mialgia não-inflamatória, mioespaço, mialgia centralmente mediada e dor miofascial. As disfunções articulares incluem quatro grandes classes, a citar desarranjos internos articulares como deslocamento do disco articular com e sem redução; alterações inflamatórias como sinovite, capsulite, retrodiscite e osteoartrite; incompatibilidade estrutural das superfícies articulares; e desordens inflamatórias de estruturas associadas (OKESON, 2000). O diagnóstico diferencial é mister para o correto tratamento, e é realizado clinicamente com o auxílio de exames complementares. Em casos de osteoartrite, entretanto, parâmetros clínicos e radiográficos não são sensíveis o suficiente para identificar essas alterações no início, destacando a importância da artroscopia. Autores sugerem que os deslocamentos de disco são fatores de risco para o desenvolvimento de alterações degenerativas como osteoartrite, e que as artrites são as entidades clínicas mais comuns encontradas nas DTMs (ISRAEL *et al.*, 1998; STEGENGA, 2001).

As modalidades de tratamento incluem terapias oclusais com placas oclusais, terapias físicas (termoterapia, terapia de resfriamento, laser, ultra-som, estimulação elétrica neural transcutâneas-TENS), fisioterapia, terapia com exercícios, terapia farmacológica, guia de orientações, acupuntura e procedimentos cirúrgicos como artroscopia, artrocentese, reposicionamento de disco e regularização das superfícies articulares (RAUSTIA *et al.*, 1985; SANDERS, 1986; NITZAN *et al.*, 1997; NICOLARIS *et al.*, 2000; OKESON, 2000).

Kircos *et al.* (1987) mostraram que em 32% da população por ele estudada havia deslocamento anterior do disco sem apresentar disfunção na ATM. Além

desse achado, sinais e sintomas às vezes persistem mesmo após tratamento clínico e/ou cirúrgico das DTM, e estudos relatam remissão espontânea dos sinais e sintomas de DTM com diagnóstico de deslocamento anterior do disco articular sem redução com o tempo (SANDLER *et al.*, 1998; KAMISAKA *et al.*, 2000; NISHIMURA *et al.*, 2004). Esses dados reiteram a importância de compreender melhor sua fisiopatologia na tentativa de se alcançar alternativas de tratamento mais eficazes.

3. Modelos experimentais para estudo das alterações inflamatórias na articulação temporomandibular

Vários modelos experimentais têm sido desenvolvidos para o estudo das alterações inflamatórias da ATM. Alguns autores propõem a indução da osteoartrite através de procedimentos cirúrgicos (YAILLEN *et al.*, 1979; HELMY *et al.*, 1988; ISHIMARU & GOSS, 1992; LEKKAS, 1994) ou mecânicos (IMAI *et al.*, 2001), outros, entretanto, induzem alterações inflamatórias através da injeção intra-articular de substâncias. Autores como Puzas (2003) acreditam ainda não haver um modelo experimental que esclareça a fisiopatologia das DTMs em todos os estágios, da fase aguda à fase crônica. De acordo com Roveroni *et al.* (2001), essa incógnita na fisiopatologia da inflamação e da dor na ATM se deve em parte à limitação de modelos experimentais e à dificuldade em mensurar parâmetros inflamatórios na região. A saber, os diferentes modelos experimentais apresentam vantagens e desvantagens que os tornam válidos dependendo da abordagem que se pretende fazer, porém há mais similaridades que diferenças entre estes modelos e a artrite na ATM, o que justifica o seu emprego.

Um dos primeiros modelos de indução de artrite na ATM através da injeção de substâncias foi desenvolvido por Zamma, em 1983, o qual utilizou estímulos mecânicos juntamente à inoculação intradérmica de adjuvante completo de Freund (CFA) na escápula parietal de ratos, sendo a artrite avaliada histologicamente. Ren (1999), fazendo uso dos filamentos de von Frey e pela indução da dor facial por CFA i.art., desenvolveu um método mecânico que permitiu estudar a dor orofacial tanto

aguda quanto cronicamente. Kerins *et al.*, em 2003 e 2005, induziram inflamação/dor aguda na ATM pela injeção de CFA, avaliando tais achados através de parâmetros comportamentais alimentares. Tominaga *et al.* (1999) injetaram o antígeno ovoalbumina para indução da artrite na ATM.

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

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

Em 1996, Carleson *et al.* injetaram substância P (i.art.) na ATM de ratos e estudaram o papel da inflamação neurogênica na artrite aguda da ATM.

Kawai *et al.*, em 2000, utilizaram IL-1 recombinante humana para indução da artrite na articulação temporomandibular de ratos e estudaram a participação de radicais livres na etiopatogenia das alterações degenerativas da ATM cronicamente.

Roveroni *et al.* (2001) administraram formalina na ATM de ratos e realizaram estudo comportamental para avaliar dor orofacial aguda. Takeuchi *et al.* (2004) induziram inflamação/dor aguda na ATM através da injeção de kaolina e carragenina e estudaram dor baseados em parâmetros comportamentais e em preparação de nervo isolado.

Para estudo da artrite reumatóide (AR) na articulação temporomandibular, Al-Mobireek *et al.* (2000) induziram a doença baseados no método de Cromartie *et al.* (1977) pela injeção sistêmica de células de estreptococcus e estudaram AR na ATM através de exames clínicos e tomográficos.

4. Artrite induzida por zymosan

O zymosan é um polissacarídeo constituinte da parede celular do fungo *Saccharomyces cerevisiae* que causa uma resposta inflamatória quando injetado intradérmica (RIDGER *et al.* 1997), intraperitoneal (RAO *et al.*, 1994; BOUGHTON-SMITH & GHELANI, 1995; AJUEBOR *et al.*, 1998) ou intra-articularmente (GEGOUT *et al.*, 1995; COMERFORD & ETWEBI, 1995; PETTIPHER & SALTER, 1996; ROCHA *et al.*, 1999).

A administração de zymosan ativa a via alternativa do sistema complemento, induz a degranulação de mastócitos a liberar aminas vasoativas como serotonina e histamina, é capaz de gerar produtos do metabolismo do ácido araquidônico, assim como de estimular a liberação de mediadores inflamatórios por macrófagos, neutrófilos e células sinoviais (JOHNSON *et al.*, 1975; KONNO & TSURUFUJI, 1983; GRIFFITHS *et al.*, 1991; COATES & McCOLL, 2001; VALE *et al.*, 2006).

A injeção intra-articular de zymosan desencadeia artrite caracterizada inicialmente por aumento da permeabilidade vascular e migração celular (ROCHA *et al.*, 1999). Posteriormente, ocorre hipertrofia sinovial, infiltração de células mononucleares, ativação de fibroblastos e formação do *pannus* (KEYSTONE *et al.*, 1977; GEGOUT *et al.*, 1994). Há ainda estudos sugerindo degradação da cartilagem articular e do osso subcondral na fase crônica da artrite por zymosan (GEGOUT *et al.*, 1995; BEZERRA *et al.*, 2004). Não existem relatos demonstrando a artrite induzida por zymosan na articulação temporomandibular de animais, sendo este um trabalho inédito na literatura.

5. Mediadores inflamatórios na disfunção temporomandibular

Pesquisas clínicas e experimentais sobre patogênese e mediadores inflamatórios envolvidos na dor, na inflamação e em processos degenerativos da articulação temporomandibular (ATM) vêm sendo desenvolvidas nessas duas últimas décadas. Alguns mecanismos já foram propostos assim como a participação

de alguns mediadores inflamatórios, entretanto, não se tem ainda uma completa compreensão de como se desencadeiam esses processos.

5.1. Citocinas

Citocinas são peptídeos extracelulares que exercem efeitos biológicos estimulatórios ou inibitórios em muitos tipos celulares. Originalmente identificada em processos inflamatórios e em respostas imunes, sabe-se que estão envolvidas em muitos processos fisiológicos. Seu principal papel na homeostase está em ativar mecanismos da resposta inflamatória e modular a reparação e a remodelação de tecidos afetados. Participam também como mediadores na fisiopatologia de doenças infecciosas, inflamatórias e em respostas imunes estando envolvidas tanto na fase aguda como na fase crônica e associadas à destruição tecidual. Em condições inflamatórias, um grande aumento da produção de citocinas coexiste com desequilíbrio entre sua produção e seu controle (DINARELLO, 1998; ALSTERGREEN, 2000).

5.1.1. Interleucina-1

A interleucina-1 (IL-1) é produzida em grandes quantidades pela membrana sinovial durante a inflamação, assim como por monócitos e macrófagos, não estando presente em tecidos normais (DINARELLO & WOLFF, 1993; TATAKIS, 1993). Consiste numa família de IL-1 α , IL-1 β e antagonista do receptor de IL-1 (IL-1ra). A IL-1 α normalmente permanece no citosol enquanto IL-1 β e IL-1ra são secretados (DINARELLO, 1998). A IL-1 β foi encontrada pela primeira vez em 1982 no fluido sinovial de articulações de joelhos de pacientes com artrite reumatóide (AR), impulsionando o desenvolvimento de muitas pesquisas a partir da coleta do líquido sinovial articular (KOPP, 1998; SHINODA & TAKAKU, 2000).

Kubota *et al.* (1997) mostraram haver relação entre a presença de IL-1 β e o desenvolvimento de osteoartrite na ATM. Alstergren *et al.* (1998, 1999) observaram aumento da dosagem de IL-1 β em ATMs acometidas por processo inflamatório quando comparado a articulações normais, e sugeriram relação entre IL-1 β e sintomatologia dolorosa, limitação nos movimentos mandibulares e destruição articular. Ijima *et al.* (2001) demonstraram que IL-1 α é capaz de induzir síntese de MMPs por condrócitos e células do disco articular.

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

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

Tominaga *et al.*, em 2004, reafirmaram a participação de IL-1 β na patogênese das DTMs, assim como Nishimura *et al.* (2004) ao mostrar que, nos casos de insucesso na realização de artrocentese, procedimento cirúrgico de lavagem articular, IL-1 β e IL-6 continuavam presentes no líquido sinovial articular.

Outros estudos sugerem que IL-1 β sensibiliza nociceptores e causa hiperalgesia, devendo atuar na fisiopatologia da dor articular advinda da ATM em pacientes com DTM (WATKINS *et al.*, 1994; JEANJEAN *et al.*, 1995; ALSTERGREN *et al.*, 1998, 2003). Exerce também as funções de ativar linfócitos, de estimular a síntese de outras citocinas como fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e interleucina-6 (IL-6) e de estimular a produção de prostaglandinas (PG), exercendo seu papel fundamental na amplificação e na perpetuação da resposta inflamatória articular (DINARELLO & WOLFF, 1993).

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

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

5.1.2. Fator de necrose tumoral alfa

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

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

Sandler *et al.* (1998), entretanto, sugeriram não haver relação entre níveis de TNF α e processo degenerativo intra-articular, mesmo resultado encontrado por Nordahl *et al.* (2000). No entanto, autores como Fu *et al.* (1995a), Emshoff *et al.* (2000), Kaneyama *et al.* (2002), Sakedai *et al.* (2004) e Hirota *et al.* (2006) concluíram que TNF α está envolvido na etiopatogênese da sinovite e da degeneração cartilaginosa em pacientes com DTM. Suzuki *et al.*, (2002) afirmaram que TNF α participa também da etiopatogênese de desarranjos internos articulares.

Sabe-se ainda que TNF α exerce também funções de ativar linfócitos, de estimular a síntese de outras citocinas como interleucina-1 (IL-1) e interleucina-6 (IL-

6), de estimular a produção de prostaglandinas (PG), de ativar condrócitos, sinoviócitos tipo B (fibroblastos-símile) e fibroblastos da cartilagem articular a sintetizarem colagenases e de ativar osteoclastos (ALSTERGREN, 2000; EMSHOFF *et al.*, 2002).

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

5.1.3. Interleucina-6

Interleucina-6 (IL-6) é sintetizada por monócitos, macrófagos, condrócitos, células sinoviais tipo A (macrófagos-símile), osteoblastos, células B e T e fibroblastos (SHINODA & TAKAKU, 2000). Suas funções são diversas incluindo ação pró-inflamatória, atuação em reações imunes, destruição cartilaginosa pela estimulação da produção de enzimas condrolíticas e colagenases, proteção da cartilagem pela indução da síntese de inibidores teciduais de metaloproteinases (TIPMs) por condrócitos e fibroblastos, estimulação da proliferação de células fibroblásticas e de osteoclastos (MIHARA *et al.*, 1995; ALSTERGREN, 2000; SHINODA & TAKAKU, 2000).

Vários autores sugeriram que IL-6 participa na fisiopatologia da DTM, não estando presente, entretanto, em articulações normais. IL-6 está envolvida no desenvolvimento de sinovite, de destruição óssea e cartilaginosa, de hiperalgesia nos tecidos articulares, e pode ser utilizado como marcador bioquímico de DTM crônicas (FU *et al.*, 1995b; SANDLER *et al.*, 1998; SHINODA & TAKAKU, 2000; KANEYAMA *et al.*, 2002, 2004, 2005b).

5.1.4. Interleucina-8

Interleucina-8 (IL-8) é uma quimiocina que ativa leucócitos e participa da migração celular, exercendo efeito principalmente sobre neutrófilos (BAGGIOLINI *et al.*, 1994). Foi detectada sua presença na sinóvia de pacientes com artrite reumatóide e osteoartrite (WESTACOTT *et al.*, 1990; KANEKO *et al.*, 2000).

Em pacientes com DTM, foram encontrados níveis elevados de IL-8 no fluido sinovial (KANEYAMA *et al.*, 2002), e foi demonstrado que a fonte de IL-8 em ATMs são células sinoviais e células inflamatórias, principalmente neutrófilos e macrófagos, e que participa na fase aguda da inflamação na ATM (SUKEDAI *et al.*, 2004).

5.2. Serotonina

Serotonina ou 5-hidroxitriptamina (5-HT) é encontrada no Sistema Nervoso Central (SNC) e em tecidos periféricos, onde é armazenada em mastócitos e plaquetas e liberada por estímulos como substância P e neuropeptídeo Y, exercendo uma multiplicidade de ações biológicas devido à variedade de receptores farmacológicos que apresenta (CARRAWAY *et al.*, 1984; KOPP, 1998).

Alstergren *et al.* (1997, 1999) observaram aumento de 5-HT no líquido sinovial de articulações acometidas por processo inflamatório e com sintomatologia dolorosa, mesmo resultado mostrado experimentalmente por Tominaga *et al.* (1999). Em pacientes com DTM e artrite reumatóide, foram detectados níveis elevados de 5-HT no plasma sanguíneo de pacientes com dor articular (KOPP & ALSTERGREN, 2002). Fredrikson *et al.* (2005) confirmaram a participação local e sistêmica de serotonina na fisiopatologia da dor articular.

Sabe-se que serotonina causa hiperalgesia via receptores 5-HT_{1A} (TAIWO & LEVINE, 1992), sensibiliza nociceptores através de receptores 5-HT_{2A} em terminações nervosas periféricas (TOKUNAGA *et al.*, 1998) e participa da nocicepção craniofacial profunda existente em DTM através de receptores 5-HT_{2A} (OKAMOTO *et al.*, 2005) e 5-HT₃ (OKAMOTO *et al.*, 2004). Foi demonstrado efeito

analgésico de injeção i.art. de antagonista do receptor de serotonina 5-HT₂ em pacientes com DTM apresentando altos níveis de 5-HT plasmático (VOOG *et al.*, 2004).

5.3. Neuropeptídeos

Neuropeptídeos, neurotransmissores que atuam também como mediadores inflamatórios, são liberados pelas terminações nervosas nociceptivas, contribuem para as reações inflamatórias, caracterizando a inflamação neurogênica, e participam da fisiopatologia de várias condições inflamatórias, incluindo as artrites (KOPP, 1998).

Neuropeptídeos como a neurocinina A (NKA), o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), a substância P (SP), o peptídeo intestinal vasoativo (VIP) e o neuropeptídeo Y (NPY) foram detectados em pacientes com alterações degenerativas na ATM (HOLMUND *et al.*, 1991). Carleson *et al.* (1996) observaram a presença dos neuropeptídeos NKA, NPY e CGRP, e Spears *et al.* (2005), CGRP e fator de crescimento neuronal (NGF), ambos em fluido sinovial da ATM de ratos com artrite. Sato *et al.* (2004) sugeriram que CGRP participa da etiopatogênese de desarranjos internos articulares e parece ser importante na fisiopatologia da dor articular.

Sabe-se que substância P, neurocinina A e CGRP sensibilizam fibras nociceptivas C. O peptídeo intestinal vasoativo e o neuropeptídeo Y interagem com fibras efentes simpáticas. A substância P estimula sinoviócitos a produzirem prostaglandinas. A substância P e o neuropeptídeo Y estimulam liberação de 5-HT, e a substância P e a neurocinina A estimulam linfócitos a produzirem interleucinas. Dessa maneira, observa-se a relevante participação desses mediadores inflamatórios na etiopatogenia e na perpetuação dos processos de dor, de inflamação e de degeneração articular (SANDLER *et al.*, 1998).

5.4. Derivados do ácido araquidônico

O ácido araquidônico é proveniente de fosfolipídeos de membrana celular via fosfolipase A₂, sendo transformado em prostaglandinas (PG), pela ação da enzima cicloxigenase (COX) e em leucotrienos pela ação da enzima lipoxigenase (SHIMIZU & WOLFE, 1990).

Há duas isoformas da enzima cicloxigenase: COX-1, sintetizada constitutivamente; e COX-2, induzida durante processos inflamatórios, sendo comprovada também sua presença constitutivamente em alguns tecidos (DAVIES *et al.*, 1984). Recentemente, foi descrita uma terceira isoenzima COX-3 compartilhando todas as características catalíticas e estruturais tanto da COX-1, como da COX-2 (CHANDRASEKHARAN *et al.*, 2002).

As ações da prostaglandina E₂ (PGE₂) são múltiplas incluindo um importante papel na inflamação por mediar vasodilatação, aumentar permeabilidade vascular e sensibilizar nociceptores periféricos (DAVIES *et al.*, 1984). Em articulações, a membrana sinovial é a maior fonte de PGE₂ para o fluido sinovial durante processos inflamatórios (WITTENBERG *et al.*, 1993).

Leucotrienos estão envolvidos em mecanismos de ativação e quimiotaxia de neutrófilos e eosinófilos, sendo produzidos em células como PMN, monócitos, macrófagos e mastócitos (HENDERSON, 1994). Foi discutida sua participação na hiperalgesia (BISGAARD & KRISTENSEN, 1985) e no desenvolvimento da artrite (GRIFFITHS *et al.*, 1995, 1997)

Quinn e Bazan (1990) primeiramente demonstraram a presença de PGE₂ e leucotrieno B₄ (LTB₄) em ATMs acometidas por processos inflamatórios, o que foi negado por Murakami *et al.* em 1998. Entretanto, Alstergren e Koop (2000) ratificaram a presença de PGE₂ em ATMs com desordem inflamatória e sintomatologia dolorosa, Nishimura *et al.* (2002), a presença de LTB₄ em articulações com sinovite, e Arinci *et al.* (2005) confirmaram a participação de PGE₂ e LTB₄ em pacientes com DTM apresentando desarranjos internos.

Quinn *et al.* (2000) compararam valores de PGE₂ e a expressão de COX-2 no líquido sinovial e no tecido sinovial retrodiscal de pacientes com alterações intra-articulares, e observaram que a enzima se encontrava hiperexpressa nas amostras.

Kerins *et al.* (2004) mostraram ainda que o uso de inibidores seletivos da COX-2 reduziu inflamação e dor na ATM em ratos.

6. Óxido nítrico

6.1. Biossíntese

Óxido nítrico (NO) é uma pequena molécula composta por um átomo de oxigênio e nitrogênio, apresentado um elétron desemparelhado, o que o torna altamente reativo, com meia-vida de 2 a 30 s. Dessa forma transforma-se espontaneamente em nitrito e nitrato (CHRISTOPHERSON & BREDET, 1997). Essa característica permite que ele seja um mensageiro molecular ideal, podendo difundir-se livremente através das membranas (LOWENSTEIN *et al.*, 1994).

NO é formado através de uma reação catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) em que o oxigênio molecular (O₂) é fonte do oxigênio e a L-arginina é a fonte do nitrogênio de seu grupo guanidino terminal (MONCADA *et al.*, 1991, 1993). Diversos tipos celulares são capazes de sintetizar NO como células endoteliais (LAMAS *et al.*, 1992), macrófagos (DI ROSA *et al.*, 1990), neutrófilos (WRIGHT *et al.*, 1989), fibroblastos (WERNER-FELMAYER *et al.*, 1990), osteoblastos e osteoclastos (EVANS & RALSTON, 1996), células neuronais (KNOWLES *et al.*, 1989), sinoviócitos (MCINNES *et al.*, 1996) e condrócitos (STADLER *et al.*, 1991).

Três isoformas distintas da NOS foram identificadas: uma isoforma neuronal (NOS_n), inicialmente isolada do cérebro (BREDET *et al.*, 1991; SESSA *et al.*, 1992), uma endotelial (NOS_e), isolada do endotélio (LAMAS *et al.*, 1992) e uma isoforma induzida, isolada inicialmente de macrófagos (XIE *et al.*, 1992). NOS_n e NOS_e são expressas constitutivamente em seus tecidos de origem, portanto referidas como NOS constitutivas (NOS_c), enquanto a NOS_i é expressa durante processos patológicos.

Algumas diferenças entre as enzimas NOS_c e NOS_i podem ser descritas. As NOS_c são cálcio-calmodulina dependentes e produzem picomoles de NO por curtos

períodos de ativação regulando várias respostas fisiológicas. NOS_i, entretanto, é expressa após ativação por citocinas ou lipopolissacarídeos bacterianos (LPS), é cálcio-calmodulina independente e produz nanomoles de NO por períodos prolongados de ativação (RANG *et al.*, 2004).

Óxido nítrico pode ainda ser gerado independente de enzimas a partir do nitrito no ambiente ácido do estômago e farmacologicamente por compostos doadores de NO usados clinicamente como vasodilatadores (MONCADA *et al.*, 1993).

6.2. Ações do óxido nítrico

O NO produzido se difunde através das membranas para as células-alvo, onde ativa o sistema da guanilato ciclase com o aumento da produção de guanilato monofosfato cíclico (GMPc), através do qual exerce seus efeitos biológicos (RALSTON & GRABOWSKI, 1996). Existem, contudo, evidências da ação do NO independente do sistema L-arginina/NO/GMPc, como em osteoclastos (MaCINTYRE *et al.*, 1991).

Foi relatada a participação do NO nos mecanismos de controle da pressão arterial (FURHGOTT, 1983; IGNARRO *et al.*, 1987), na fisiopatologia da aterosclerose (HERMAN & MONCADA, 2005) e de outras patologias do sistema cardiovascular (MONCADA & HIGGS, 2008), na inibição da aderência e agregação de plaquetas, leucócitos, neutrófilos e monócitos (KUBES *et al.*, 1991, 1993; BELENKY *et al.*, 1993a, 1993b; THOMASSEN & KAVURU, 2001), assim como na modulação da migração celular dependente do sítio inflamatório (LEITE, 2005). Centralmente, NO atua na neurotransmissão e na plasticidade neuronal (SOUTHAM & GARTHWAITE, 1993; HOLSCHER, 1997), periféricamente na transmissão neuronal através do sistema de nervos não-adrenérgicos e não-colonérgicos (NANC) (RAND, 1992) além do envolvimento nos mecanismos de ereção peniana (RAJFER *et al.*, 1992). Sabe-se que NO produzido pela NOS_i reage com ânion superóxido para formar ânion peroxinitrito, que é altamente citotóxico (BECKMAN *et al.*, 1990). Há trabalhos, portanto, evidenciando o papel imunomediador e citotóxico e citostático do NO na defesa inespecífica do organismo contra células tumorais e

patógenos como bactérias, fungos e parasitas (FANG, 1997; COLASANTI *et al.*, 2002).

6.3. Óxido nítrico e artrite

NO é produzido pelas células residentes articulares sinoviócitos e condrócitos, assim como por osteoblastos e osteoclastos, e também por células inflamatórias presentes durante patologias, de forma constitutiva ou induzida por mediadores como IL-1 e TNF α (STADLER *et al.*, 1991; McINNES *et al.*, 1996; EVANS & RALSTON, 1996). Dessa maneira, estudos sobre sua participação em artropatias têm sido desenvolvidos.

Em pacientes com artrite reumatóide (AR) e osteoartrite (OA), foi detectada elevada concentração de nitrito (produto da degradação de NO) e de s-nitrosoproteínas (forma ativa estável de estoque de NO) no plasma e no fluido sinovial, aumento da excreção urinária de nitrato (produto da degradação de NO) e presença de NOSi em células sinoviais, condrócitos e células do músculo liso vascular articulares (FARRELL *et al.*, 1992; STICHTENOTH *et al.*, 1995; UEKI *et al.*, 1996; McINNES *et al.*, 1996; GRABWSKI *et al.*, 1997; HILLIQUIN *et al.*, 1997).

Em modelos de artrite por *Streptococcus*, foi comprovado o aumento da produção de NO, de maneira que o uso de inibidores de sua síntese N^G-monometil-L-arginina (L-NMMA) reduziu edema e infiltrado celular (McCARTNEY-FRANCIS *et al.*, 1993). Em artrite induzida por colágeno, observou-se expressão de NOSi em tecido sinoviais (CANNON *et al.*, 1996), sendo esta expressão inibida pela administração de inibidores seletivos da NOSi aminoguanidina ou N-iminoetil-L-lisina (L-NIL) (VERMEIRE *et al.*, 2000).

Demonstrou-se a participação do NO em modelo experimental de artrite induzida por zymosan em joelho de ratos, com a redução dos níveis de nitrito e da dor articular ao administrar-se inibidores da síntese de NO, L-N^G-nitroarginina metil éster (L-NAME), aminoguanidina (AG) e N-(3-(aminometil)benzil)acetamidina (1400W) (ROCHA *et al.*, 2002). Esse mesmo trabalho evidenciou o efeito dual do NO, ao administrar doadores de NO S-morfolinosidnoimina (SIN-1) e nitroprussiato

de sódio (NPS), e também obter como resultado redução da dor articular. Mostrou-se ainda, neste modelo, que o NO participa da inflamação e da dor articular pela via L-arginina/NO/GMPc (ROCHA *et al.*, 2003).

Apesar dos diversos trabalhos na literatura, ainda não está claro a maneira pela qual o NO participa na fisiopatologia da artrite, pois parece promover ações pró-inflamatórias como aumento da permeabilidade vascular, produção de radicais livres capazes de causar danos teciduais, indução de ciclooxigenase e de citocinas inflamatórias (LANDER *et al.*, 1993; McINNIS *et al.*, 1996), concomitante à sua ação antiinflamatória, como inibição da adesão plaquetária e neutrofílica e redução da migração leucocitária ao sítio inflamatório (KUBES *et al.*, 1991, 1993; BELENKY *et al.*, 1993a, 1993b; THOMASSEN & KAVURU, 2001).

6.4. Óxido nítrico e disfunção temporomandibular

Estudos vêm sendo desenvolvidos na tentativa de compreender a fisiopatologia das DTMs e a participação do NO nesse processo. Níveis elevados de NO foram encontrados no líquido sinovial (LS) de pacientes com disfunção temporomandibular (TAKAHASHI *et al.*, 1996). Esses mesmos autores observaram o aumento da concentração de NO no LS de pacientes com dor articular, desarranjos internos articulares e osteoartrite diagnosticados clínica e artroscopicamente (TAKAHASHI *et al.*, 1999). Também através da coleta de líquido sinovial e dosagem de nitrito/nitrato, Suenaga *et al.* (2001) ratificaram a participação de NO na dor articular em pacientes com DTM.

Homma *et al.* (2001) primeiramente descreveram a presença de NOSi em células sinoviais e vasculares na ATM de pacientes com desarranjos internos articulares. Takahashi *et al.* (2003) e Nagai *et al.* (2003) observaram que a enzima NOSi estava expressa em tecidos sinoviais de articulações com sinovite, desarranjos internos articulares e osteoartrite, enquanto não se expressou ou pouco se expressou em tecidos normais. Yamaza *et al.* (2003) demonstraram a expressão de NOSi em tecidos sinoviais de ATM com sinovite concomitante à expressão de NF- κ B, fator de transcrição importante na regulação de genes relacionados à inflamação.

Masuda *et al.* (2002), entretanto, demonstraram através de microscopia eletrônica a presença da enzima NOSi em células sinoviais tipo A (macrófagos-símile) e tipo B (fibroblastos-símile) em ATMs normais, sugerindo sua participação fisiológica.

Kawai *et al.* (2000) sugeriram que espécies reativas de oxigênio participam da progressão da artrite nas DTMs. Nagai *et al.* (2003) mostraram correlação entre a expressão de NOSi e de Fas e de ssDNA, ambos relacionados a eventos de apoptose, sugerindo que a apoptose induzida por estresse oxidativo, em cujo processo NO participa como modulador, pode estar envolvida na fisiopatologia dos processos inflamatórios e degenerativos da ATM. Validando esses resultados, Yamaza *et al.* (2004) observaram a expressão de NOSi e de nitrotirosina, produto da reação de peroxinitrito, formado durante reação de NO com ânion superóxido e responsável por alguns efeitos tóxicos do NO, em ATMs com sinovite.

Sabe-se que NO induz uma série de eventos pró-inflamatórios e que é produzido por sinoviócitos, condrócitos, osteoblastos, osteoclastos, células inflamatórias e por células do músculo liso vascular articulares. Seus efeitos catabólicos em condrócitos resultam em perda da matriz fundamental dos tecidos e se caracterizam por inibir a síntese de colágeno e de proteoglicanas, induzir a síntese de metaloproteinases e aumentar a susceptibilidade à injúria por outros oxidantes (AMIN & ABRAMSON, 1998). Altas concentrações de NO inibem a formação de osteoclastos e a atividade de osteoclastos maduros, assim como inibem proliferação osteoblástica. Em concentrações moderadas, NO potencia reabsorção óssea, e, em baixas concentrações, promove proliferação de células semelhantes a osteoblastos e modula a função osteoblástica (EVANS & RALSTON, 1996).

O NO parece estar envolvido nos três níveis de percepção da dor, ou seja, periférico, espinhal e cerebral. Especificamente na dor articular nas DTMs, NO parece sensibilizar nociceptores periféricos articulares pela indução da liberação de PGE₂, ou por inibir a ação de substâncias antinociceptivas endógenas, ou diretamente e talvez pela via L-arginina/NO/GMPc/proteína quinase G/canais de potássio sensíveis a ATP (ANBAR & GRATT, 1997, 1998; SACHS *et al.*, 2004). Existe também trabalho mostrando o efeito dual do NO na dor articular dependente da sua concentração (ROCHA *et al.*, 2002).

Esses achados sugerem a participação do NO na patogênese da sinovite, de desarranjos internos articulares, de alterações degenerativas e da dor na articulação temporomandibular. Não se sabe, entretanto, a maneira pela qual o NO participa dessas alterações, requerendo estudos adicionais para melhor compreensão.

Em função de não se conhecer adequadamente os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da inflamação na articulação temporomandibular, há protocolos de tratamentos clínicos estabelecidos sem, entretanto, haver tratamento farmacológico adequado para esta entidade, visto a importância dos mediadores inflamatórios no desenvolvimento e perpetuação das DTMs. Estudos em diferentes modelos experimentais são importantes, pois podem contribuir para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas e ajudar no melhor entendimento da fisiopatologia da doença.

II. OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

1. Objetivos gerais

Desenvolver um modelo experimental de artrite induzida por *zymosan* na articulação temporomandibular de ratos que contribua para o estudo do processo inflamatório na articulação temporomandibular tanto aguda quanto cronicamente. A seguir, tivemos como objetivo estudar o papel do NO e o efeito de inibidores da síntese de óxido nítrico nesta condição patológica, iniciando, assim, a caracterização do modelo experimental e uma discussão sobre os possíveis mecanismos envolvidos na progressão da doença.

2. Objetivos específicos

- a. Estabelecer modelo experimental de artrite na articulação temporomandibular em ratos induzida por *zymosan* que contribua para o estudo das alterações inflamatórias nesta articulação;
- b. Avaliar migração celular no líquido sinovial e nos tecidos articulares através da contagem do número de leucócitos totais e da dosagem da atividade de mieloperoxidase, respectivamente;
- c. Analisar permeabilidade vascular através do extravasamento de azul de Evans;
- d. Realizar estudo histopatológico para avaliar as alterações inflamatórias agudas e crônicas nesse modelo de artrite;
- e. Estudar o envolvimento do óxido nítrico (NO) na fisiopatologia da artrite na ATM de ratos induzida por *zymosan* através do uso de inibidores da síntese de NO, da dosagem de nitrito e da detecção de NOSi por imunohistoquímica.

III. MATERIAL E MÉTODOS

III. MATERIAL E MÉTODOS

1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar fêmeas, pesando entre 160-220 g, provenientes do Biotério Central do Campus do Pici e do Biotério Setorial da Faculdade de Medicina, ambos da Universidade Federal de Ceará. Os animais foram mantidos em caixas de plásticos com livre acesso à água e comida, obedecendo a ciclos claro/escuro. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal de Ceará.

2. Drogas, Soluções, Líquidos e Corantes

- Ácido fosfórico P.A.: Synth, Brasil
- Água destilada
- Álcool etílico 70%
- Ácido nítrico 7%
- Azul de Evans 2,5%
- 1400W: Cayman Chem. Co., USA
- Corante de Turk
 - Ácido acético glacial P.A. (Merk)20 mL
 - Violeta de genciana2 mL
 - Água estilada q.s.p.1000 mL
- Eosina: Merk
- Éter etílico P.A.: Dinâmica, Brasil
- Formaldeído P.A.: Dinâmica, Brasil
- Hematoxilina: Merk
- Hidrato de cloral: Reagen, Brasil
- L-NAME: Sigma Chem. Co., USA

- NEED: Sigma Chem. Co., USA
- Nitrato redutase: Sigma Chem. Co., USA
- Nitritio de sódio P.A.: Vetex, Brasil
- Peróxido de hidrogênio 0,1%
 - Peróxido de hidrogênio 30% (Vetev)1 mL
 - Água destilada29 mL
- Solução o-dianosidina (DDI)
 - o-dianosidina (Sigma)16,7 mg
 - Tampão fosfato de potássio10 mL
 - H₂O₂.....50 µL
 - Água destilada90 mL
- Solução salina 0.9%: Criatália – Brasil – estéril
- Sulfato de sódio P.A.: Synth, Brasil
- Sulfanilamida: Sigma Chem. Co., USA
- Tampão de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB)
 - HTAB (Sigma)5 g
 - Tampão fosfato de potássio1 L
- *Zymosan*: Sigma Chem. Co., USA

3. Protocolo experimental

3.1. Descrição do modelo experimental - Indução da artrite na ATM por *zymozan*

Os animais foram anestesiados com hidrato de cloral a 10% via intra-peritoneal (i.p.) (0,1 mL/ 35 g) para proceder à injeção intra-articular (i.art.) de *zymosan* (40µL) dissolvido em solução salina estéril na ATM esquerda dos animais utilizando-se agulha de insulina com calibre de 29G em seringa de 0,1 mL. Primeiramente, realizou-se depilação do local, quando então a agulha foi inserida no ponto imediatamente inferior à borda posterior do arco zigomático e avançada em

direção medial e anterior até contato com o côndilo. Esse contato foi verificado movimentando a mandíbula, e a punção da agulha no espaço articular foi confirmada pela perda de resistência, quando se injetou 40 µL de Zy. Os animais utilizados como controles receberam 40 µL de solução salina i.art.

3.2. Estudo da dose-resposta

Foi realizada curva dose-resposta pela aplicação de Zy nas doses de 0,25; 0,5; 1 ou 2 mg para definir a dosagem experimental a ser utilizada pela contagem do influxo celular no líquido sinovial.

3.3. Estudo da cinética do influxo celular no líquido sinovial

Artrite na ATM foi induzida conforme descrito anteriormente e com Zy na dose ideal estabelecida no protocolo anterior, e os animais foram sacrificados nos tempos 3 h, 6 h, 1, 2, 3, 5, 7 e 10 d para estudar artrite através da contagem do influxo celular no líquido sinovial.

3.4. Parâmetros avaliados

3.4.1. Contagem do influxo celular no líquido sinovial

Nos tempos 3 h, 6 h, 1, 2, 3, 5, 7 e 10 d após administração de Zy na dose ideal pré-estabelecida, os animais serão anestesiados com hidrato de cloral 10% e sacrificados por decapitação e exsanguinação. Procedeu-se dessecação dos tecidos superficiais até atingir a ATM para coleta do fluido sinovial. A seguir, as ATM esquerdas foram lavadas com volumes de 0,1 mL (2 x) de solução salina

heparinizada. Dos lavados articulares obtidos, retiramos uma alíquota que, após coloração em solução de Turk, foi utilizada para contagem total do número de células utilizando câmara de Neubauer em microscópio óptico com aumento de 20 x. O restante do lavado foi centrifugado a 4°C com 1500 rpm durante 10 minutos, e o sobrenadante foi colhido e armazenado em tubos de eppendorfs no freezer a -70°C para posterior dosagem de nitrito/nitrato.

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

Azul de Evans foi medido quantitativamente por espectrofotometria nos tempos 1, 6 e 24 h. O líquido foi injetado intravascular (i.v.), na veia da calda, na dose de 25 mg/kg, dissolvido em salina, 30 minutos antes do sacrifício. Baseado no método de extração de azul de Evans de Kwan *et al.* (1996), imediatamente após a extração do tecido articular, este foi pesado e imergido em solução de 2 mL de formaldeído, assim mantido “overnight”. O sobrenadante (100 µl) foi extraído, sua absorbância foi determinada através de espectrofotômetro em 630 nm, e sua concentração determinada pela comparação com uma curva padrão da mesma amostra. A quantidade de azul de Evans foi expressa em µg e calculada por peso da amostra.

3.4.3. Ensaio de mieloperoxidase

Mieloperoxidase (MPO) é uma enzima presente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos e tem sido utilizada como um marcador quantitativo da infiltração de neutrófilos nos processos inflamatórios em vários tecidos. Para tanto, 100 a 200 mg de tecido articular, depois de pesados, foram colocados num tampão de potássio com 0,5% de brometo de hexadecitrimetilamônio (pH 6,0; 50 mg de tecido por mL) e posteriormente homogeneizados em um Politron. A seguir, o homogenato foi

centrifugado a 4500 rpm por 12 minutos a 4°C, e o sobrenadante foi colhido. A atividade da MPO por mg de tecido foi aferida na 6ª h após indução da artrite através da técnica descrita por Bradley *et al.* (1982), utilizando 0,0005% de peróxido de hidrogênio como substrato para a MPO. A unidade da atividade de MPO foi definida como aquela capaz de converter 1 μmol de peróxido de hidrogênio em água em 1 minuto a 22° C. Durante o ensaio, à medida que o peróxido de hidrogênio era degradado ocorria a produção do ânion superóxido, responsável pela conversão de o-dianosidine em um composto de cor marrom. Os resultados foram expressos como atividade de MPO/g de tecido (BRADLEY *et al.*, 1982).

3.4.4. Dosagem de nitrito – determinação da produção de óxido nítrico

A produção de NO é obtida através da determinação do conteúdo total de nitrito/nitrato ($\text{NO}_2^- / \text{NO}_3^-$) no lavado articular através da concentração total nas amostras determinada espectrofotometricamente pela reação de Griess. O nível total de $\text{NO}_2^- / \text{NO}_3^-$ foi determinado com NO_3^- das amostras (0,04 mL) convertido em NO_2^- pela incubação em um solução de 0,04 mL de nitrato redutase, NADPH, KH_2PO_4 e água destilada “overnight”. Utilizam-se placas de 96 poços, adicionando 80 μL da amostra experimental em cada poço, em duplicata. Uma série de diluições da curva-padrão de referência de NO_2^- (640 μM, 320 μM, 160 μM, 80 μM, 40 μM, 20 μM, 10 μM, 5 μM, 2,5 μM, 1,25 μM e 0,625 μM) é preparada. A seguir, são colocados 80 μL da solução de Griess (2% de sufamilamida, ácido fosfórico 5%, NEED e água destilada) em cada poço. A coloração púrpura/magenta aparece imediatamente e é medida em leitor de placas com filtro de 540 nm. Os valores obtidos para as amostras experimentais são comparados com os obtidos para curva padrão. A coloração é estável por até 30 min.

3.4.5. Análise histopatológica da ATM

Nos períodos de 6 h, 10 e 21 d, após administração de zymosan, os animais foram anestesiados com hidrato de cloral 10%, sacrificados por decapitação e exsangüinação e tiveram suas ATMs removidas. As articulações foram fixadas em formol 10% por 24 h, desmineralizados em ácido nítrico 5%, mantidas em ácido sulfúrico 5% por 24 h e depois em água corrente por mais 24 h. Após foram desidratados, embebidos em parafina e seccionados no longo eixo da ATM, em secções de 4 µm, que incluíam cômulo, cartilagem articular, tecido periarticular e disco articular para coloração pelos métodos de eosina-hematoxilina e Tricrômio de Mallory.

Para as amostras nas quais foi utilizada coloração hematoxilina-eosina (HE), a região articular foi analisada em microscópio óptico Leica acoplado a computador com aumento de 40 x utilizando os escores de 0 a 4 de acordo com a intensidade dos achados, considerando influxo celular inflamatório na membrana sinovial (MS), espessamento da MS, fibrose da MS, influxo celular inflamatório para o tecido periarticular e influxo celular inflamatório no tecido muscular esquelético. Para visualização dos tipos celulares presentes em cada fase da artrite, utilizamos aumento de 400 x.

Para as amostras nas quais foi utilizada coloração de tricrômio de Mallory (TM), a região articular foi analisada em microscópio óptico acoplado a computador com aumento de 40 x utilizando os escores de 0 a 4 de acordo com a intensidade dos achados, considerando nível de fibrose da cartilagem articular, nível de fibrose da MS, do disco articular e do tecido periarticular. Em ambas as colorações, foi realizado estudo cego para atribuir os parâmetros histopatológicos às amostras.

3.4.6. Estudo da reação de imunohistoquímica para NOSi

Imunohistoquímica para NOSi foi realizada utilizando método de estreptavidina-biotina-peroxidase (HSU *et al.*, 1981). Na 6ª h após administração de

zymosan, os animais foram anestesiados com hidrato de cloral 10%, sacrificados por decapitação e exsanguinação e tiveram suas ATMs removidas. As articulações foram fixadas em formol 10% por 24 h e desmineralizados por EDTA a 5%. Após foram desidratados, embebidos em parafina e seccionados no longo eixo da ATM, em secções de 4 µm, que incluíam cômulo, cartilagem articular, tecido periarticular e disco articular em lâminas microscópicas de poli-L-lisina. Os cortes foram desparafinizados e reidratados em xileno e álcool. Após recuperação com antígeno, peroxidase endógena foi realizada (15 min) com 3% (v/v) de peróxido de hidrogênio e lavada em tampão fosfato (PBS). Os cortes foram incubados “overnight” (4°C) com anticorpo primário anti-NOSi de coelho diluído 1:100 em PBS com albumina sérica bovina (PBS-BSA). Os cortes foram então incubados com “biotinylated goat anti-rabbit”; diluído 1:400 em PBS-BSA. Depois de lavado, os cortes foram incubados com “avidin-biotin-horseradish peroxidase” conjugada (Strep ABC complexo pela Vectastain® ABC Reagent e solução de substrato de peroxidase) por 30 minutos, de acordo com o protocolo de Vectastain. NOSi foi visualizada com o cromógeno 3,3`diaminobenzidine (DAB). Controles negativos foram processados simultaneamente como descrito acima, sendo que o primeiro anticorpo foi substituído por PBS-BSA 5%. Nenhum dos controles negativos mostraram imunoreatividade para NOSi. Os cortes foram corados com hematoxilina, desidratados em uma série de concentrações de álcool, clareados em xilol e, em seguida, a lâmina foi colocada.

4. Modulação farmacológica

Com a finalidade de estudarmos o efeito de inibidores da síntese de NO na fase aguda da artrite na ATM de ratos induzida por *zymosan*, utilizamos, profilaticamente, L-N^G-nitroarginina metil éster (L-NAME) e N-((3-(aminoetil) fenil) metil) etanimidamida (1400W) nos grupos experimentais que foram tratados 30 min antes da injeção de Zy.

4.1. Inibidores da síntese de óxido nítrico

- **L-NAME:** inibidor não seletivo de NOS, diluído em solução salina estéril (0,9%), foi administrado nas doses de 10, 30 ou 100 mg/kg i.p.
- **1400W:** inibidor seletivo da NOSi, diluído em solução salina estéril (0,9%), foi administrado nas doses 0,5 ou 1 mg/kg s.c.

5. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). As médias dos vários procedimentos experimentais foram comparadas utilizando a análise de variância (ANOVA), e a significância entre os grupos estabelecida pelo teste Bonferroni. Para análise dos resultados da dosagem da atividade de MPO, utilizou-se teste t para dados pareados. À análise histopatológica, os dados foram expressos em medianas e foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis e Dunn's para diferenciação estatística. O número (n) de animais por grupo experimental foi no mínimo 5. A significância mínima foi aceita ao nível de $p < 0,05$.

IV. RESULTADOS

IV. RESULTADOS

1. Modelo experimental de artrite na ATM induzida por zymosan em ratos

1.1. Estudo da dose-resposta

A injeção de Zy 2 mg na articulação temporomandibular esquerda de ratos foi capaz de induzir inflamação na ATM de forma significativa ($p < 0,05$) em comparação ao grupo controle, o mesmo não ocorrendo com as demais doses de *zymosan*, observados através da contagem de leucócitos totais no líquido sinovial articular na 6ª hora após indução da artrite (**figura 2**).

1.2. Estudo da cinética do influxo celular no líquido sinovial

Observou-se, a partir da contagem do influxo celular no líquido sinovial articular, que na 6ª h após indução da artrite na ATM por Zy 2 mg houve pico de influxo celular ($p < 0,05$) comparado ao grupo controle, caracterizando processo inflamatório agudo, diminuindo após 1 dia, embora ainda permaneça significativamente maior em relação ao grupo controle durante 1º ($p < 0,05$) e 2º ($p < 0,05$) dias após indução da artrite na ATM (**figura 3**).

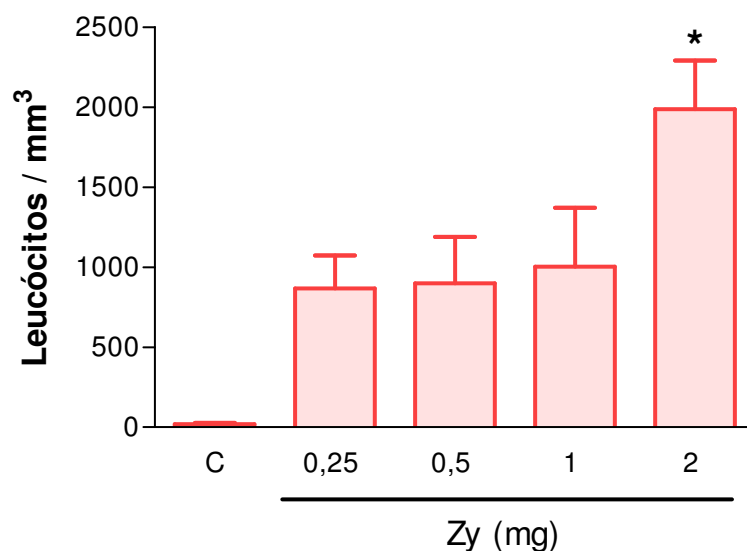


Figura 2. Curva dose-resposta da migração de leucócitos totais no líquido sinovial da ATM de ratos induzida por zymosan (Zy). Administração i.art. de 40 μ L de Zy na ATM de ratos nas doses de 0,25; 0,5; 1 e 2 mg. O grupo controle (C) recebeu 40 μ L solução salina i.art. A contagem celular do fluido sinovial foi realizada na 6^a h após a indução da artrite. Zy 2 mg foi capaz de induzir aumento da migração celular registrada no fluido sinovial na 6^a h após indução da artrite. Os dados representam uma média \pm epm (n=6). * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (C) (ANOVA, Bonferroni).

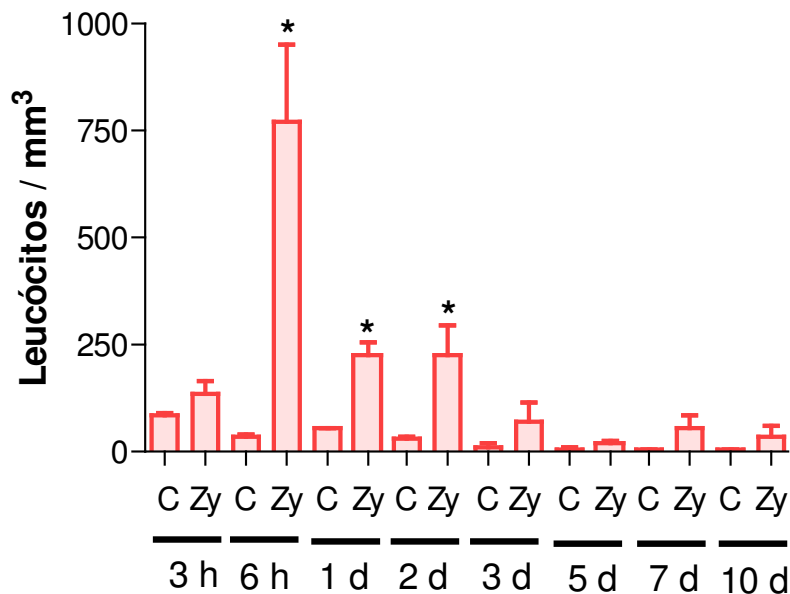


Figura 3. Cinética da migração leucocitária da artrite na ATM de ratos induzida por zymosan (Zy). A artrite na ATM de ratos foi induzida pela administração i.art. 40 μ L de Zy 2 mg. O grupo controle (C) recebeu 40 μ L solução salina i.art. A contagem celular do líquido sinovial foi realizada nos tempos 3 h, 6 h, 1, 2, 3, 5, 7 e 10 d após a indução da artrite. Zy 2 mg foi capaz de induzir aumento da migração celular registrada no fluido sinovial na 6^a h, 1 e 2 d após indução da artrite. Os dados representam uma média \pm epm (n=6). * p <0,05, em relação ao grupo controle (C) (Teste t).

1.3. Estudo do extravasamento de azul de Evans / Análise da permeabilidade vascular

O influxo celular no líquido sinovial é acompanhado de aumento da permeabilidade vascular na ATM dos animais, que apresentou pico de extravasamento plasmático na 6^a h após indução da artrite por Zy de forma significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle, permanecendo significativamente na 24^a h ($p < 0,05$) comparado ao grupo controle (**figura 4**).

1.4. Estudo da atividade de mieloperoxidase

O aumento da contagem de leucócitos totais no líquido sinovial e o aumento da permeabilidade vascular na ATM dos animais foram acompanhados pelo aumento da atividade de mieloperoxidase nos tecidos articulares, que se apresenta elevada na 6^a hora após indução da artrite na ATM por Zy 2 mg de forma significativa ($p < 0,05$) comparado ao grupo controle (**figura 5**).

1.5. Estudo da dosagem de nitrito/nitrato – determinação da produção de óxido nítrico

A administração i.art. de Zy nas doses de 1 e 2 mg promoveu formação significativa ($p < 0,05$) de nitrito/nitrato no líquido sinovial articular na 6^a h após indução da artrite na ATM, quando comparado ao grupo controle, avaliada através da reação de Griess (**figura 6**).

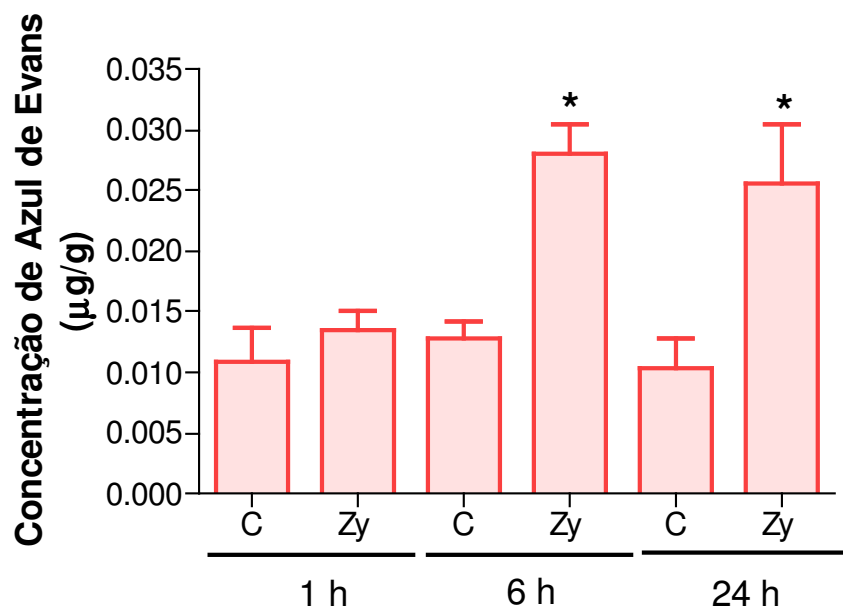


Figura 4. Estudo do extravasamento de azul de Evans / análise da permeabilidade vascular da artrite na ATM em ratos induzida por zymosan (Zy).

A artrite na ATM de ratos foi induzida através da administração de 40µL de Zy 2 mg/i.art.. O grupo controle (C) recebeu 40µL solução salina i.art. Azul de Evans 25 mg/kg foi injetado 30 minutos antes do sacrifício via i.v., na veia da calda. Os animais foram sacrificados nos tempos 1, 6 e 24 h após indução da artrite, e suas ATMs esquerdas removidas. Zy 2 mg foi capaz de aumentar na 6^a e 24^a h após indução da artrite a permeabilidade vascular detectada através do extravasamento do Azul de Evans. Os dados representam uma média ± epm (n=6). * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (C) (ANOVA, Bonferroni).

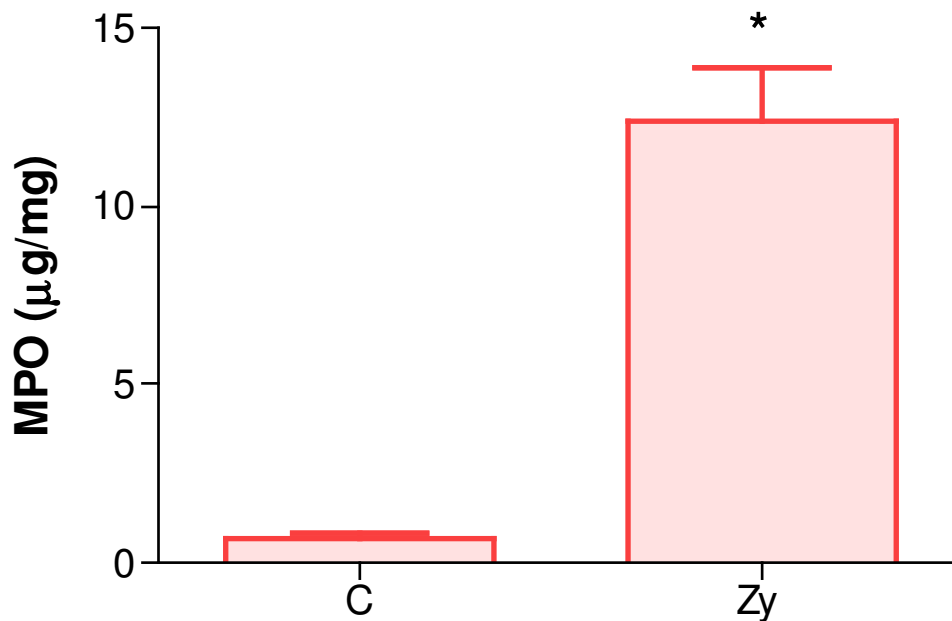


Figura 5. Estudo da atividade de mieloperoxidase na artrite da ATM de ratos induzida por zymosan (Zy). A artrite na ATM de ratos foi induzida através da administração de 40µL de Zy 2 mg/i.art.. O grupo controle (C) recebeu 40µL solução salina i.art. Os animais foram sacrificados na 6ª h após indução da artrite, e suas ATMs esquerdas removidas para análise da atividade de mieloperoxidase. Zy 2 mg foi capaz de aumentar atividade de mieloperoxidase (MPO) na 6ª após indução da artrite. Os dados representam uma média \pm epm (n=6). * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (C) (Teste t).

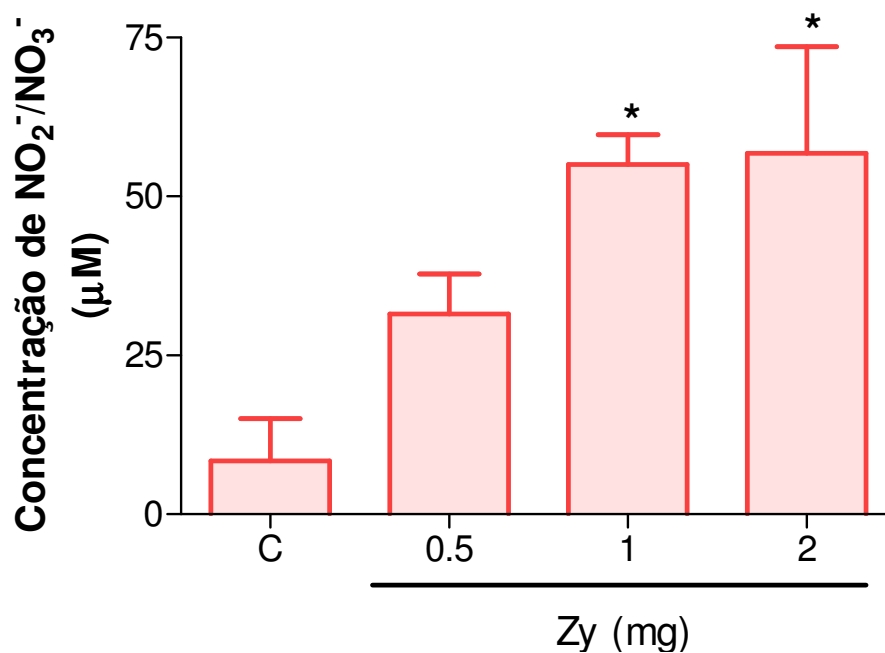


Figura 6. Estudo da dosagem de nitrito/nitrato – determinação da produção de óxido nítrico da artrite na ATM de ratos induzida por zymosan (Zy). A artrite na ATM de ratos foi induzida através da administração de 40µL de Zy 2 mg/i.art.. O grupo controle (C) recebeu 40µL solução salina i.art. Administrou-se *zymosan* i.art. de nas doses de 0,5; 1 e 2 mg. Os animais foram sacrificados na 6^a h, e o líquido sinovial foi coletado para dosagem de nitrito/nitrato através da reação de Griess. Zy 1 e 2 mg aumentaram a concentração de NO₂⁻ / NO₃⁻ na 6^a após indução da artrite. Os dados representam uma média ± epm (n=6). **p*<0,05 em relação ao grupo controle (C) (ANOVA, Bonferroni).

1.6. Análise histopatológica da ATM

As tabelas 1 e 2 representam os escores atribuídos à análise histopatológica das ATMs comparando valores entre grupos controle e grupos com artrite na ATM induzida por *zymosan* nos tempos 6 h, 10 e 21 d após indução da artrite através das colorações hematoxilina-eosina (HE) e tricrômio de Mallory (TM), respectivamente.

A análise histopatológica da ATM, realizada através da coloração HE, mostrou diferença significativa na 6^a hora, 10^o e 21^o dias após indução da artrite entre os grupos controle e Zy 2 mg. Na 6^a hora após indução da artrite, observou-se infiltrado celular inflamatório na membrana sinovial (MS), no tecido conjuntivo periarticular, no tecido muscular esquelético e espessamento da MS, não apresentando ainda fibrose da MS. No 10^o d após indução da artrite, já se observa fibrose da MS, continuando a apresentar infiltrado celular inflamatório na MS, no tecido conjuntivo periarticular, no tecido muscular esquelético e hiperplasia da MS. No 21^o d após indução da artrite, observou-se infiltrado celular inflamatório na membrana sinovial, hiperplasia e fibrose na MS, estando reduzida a infiltração celular no tecido conjuntivo periarticular e no tecido muscular esquelético. Esses achados podem ser vistos através de fotomicrografias da ATM (**figura 7**). Os tipos celulares presentes na 6^a hora após indução da artrite são predominantemente polimorfonucleares (neutrófilos) caracterizando a inflamação aguda. Neste momento podemos observar também presença de edema na MS. Já distinguindo a fase crônica da artrite, no 10^o d após indução da mesma, as células inflamatórias presentes são predominantemente mononucleares (linfócitos e macrófagos) apresentando proliferação de fibroblastos. No 21^o d após indução da artrite, encontram-se também células mononucleares (linfócitos e macrófagos) assim como fibroblastos, associados à intensa deposição de fibras colágenas, e observa-se a presença de neovascularização na membrana sinovial articular. Esses achados podem ser vistos através de fotomicrografias da sinóvia da ATM (**figura 8**).

A análise histopatológica da ATM, realizada através da coloração TM, que promove coloração de fibras colágenas em azul, mostrou diferença significativa entre os grupos controle e Zy 2 mg apenas no 10^o e 21^o dias após indução da artrite. No 10^o d após indução da artrite, já se observa fibrose da membrana sinovial, da cartilagem articular e do tecido periarticular, sendo estatisticamente significante

Tabela 1. Análise histopatológica da artrite na ATM de ratos induzida por zymosan através da coloração pelo método hematoxilina-eosina (HE).

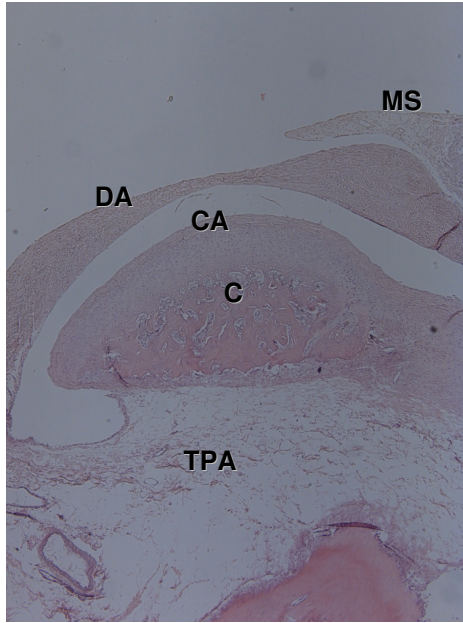
	Infiltrado celular MS	Espessamento MS	Infiltrado celular tec periarticular	Infiltrado celular tec muscular	Fibrose MS
C	0(0-0)	0(0-0)	0(0-0)	0(0-0)	0(0-0)
Zy 6h	2,5 (1-3)*	3 (0-3)*	4 (4-4)*	3 (2-4)*	0(0-0)
Zy 10d	3,5 (2-4)*	3 (2-3)*	4 (4-4)*	1,5 (1-3)*	2,5 (1-4)*
Zy 21d	3 (2-4)*	4 (2-4)*	3 (3-4)	1 (1-2)	3 (2-4)*

A artrite na ATM foi induzida através da administração de 40µL de Zy 2 mg/i.art.. O grupo controle (C) recebeu 40µL solução salina i.art. Os animais foram sacrificados nos tempos 6 h, 10 e 21 d após indução da artrite, e suas ATMs esquerdas removidas e processadas para coloração pelo método HE. Os dados representam Mediana e variação de pelo menos 5 animais, em que foram considerados para análise os seguintes parâmetros: infiltrado celular inflamatório na membrana sinovial (MS), espessamento da MS, influxo celular inflamatório para o tecido periarticular, influxo celular inflamatório no tecido muscular esquelético e fibrose da MS. * $p < 0,05$, em relação ao grupo controle (C) (Kruskal-Wallis, Dunn's).

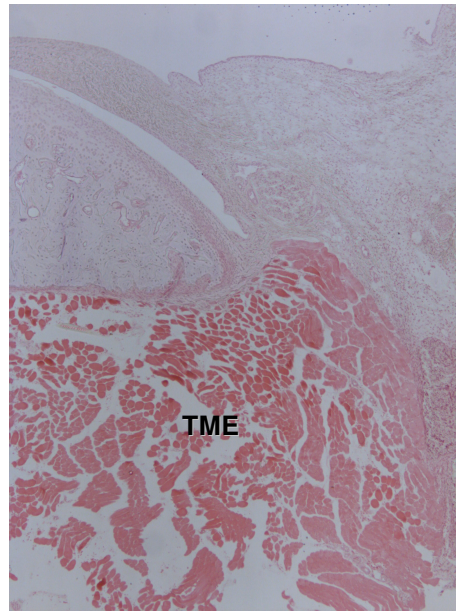
Tabela 2. Análise histopatológica da artrite na ATM de ratos induzida por zymosan através da coloração pelo método tricrômio de Mallory (TM).

	Fibrose cartilagem articular	Fibrose MS	Fibrose disco articular	Fibrose tecido periarticular
C	1 (0-1)	0 (0-1)	1 (0-2)	0 (0-1)
Zy 6h	1 (0-2)	0 (0-0)	2 (2-3)	1 (1-2)
Zy 10d	2,5 (1-3)	2 (1-3)	4 (3-4)*	2,5 (1-3)
Zy 21d	4 (3-4)*	2,5 (1-4)*	4 (3-4)*	3 (3-4)*

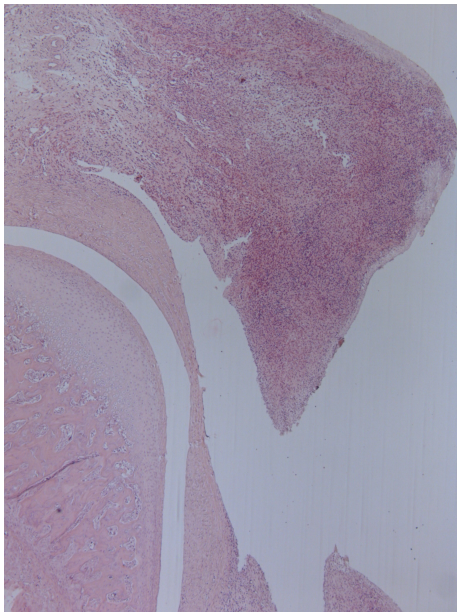
A artrite na ATM foi induzida através da administração de 40µL de Zy 2 mg/i.art.. O grupo controle (C) recebeu 40µL solução salina i.art. Os animais foram sacrificados nos tempos 6 h, 10 e 21 d após indução da artrite, e suas ATMs esquerdas removidas e processadas para coloração pelo método TM. Os dados representam Mediana e variação de pelo menos 5 animais, em que foram considerados para análise os seguintes parâmetros: fibrose da cartilagem articular, nível de fibrose da MS, nível de fibrose do disco articular e nível de fibrose do tecido periarticular. * $p < 0,05$, em relação ao grupo controle (C) (Kruskal-Wallis, Dunn's).



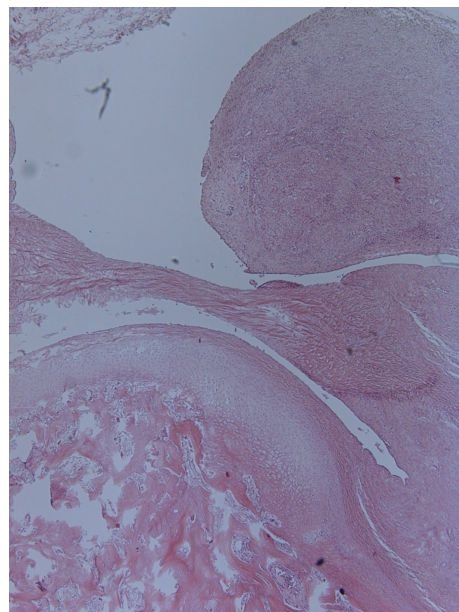
A



B



C



D

Figura 7. Fotomicrografias de ATMs de ratos normais, de animais submetidos à artrite por Zy agudo (6 h) e crônico (10 e 21 d) obtidos através da coloração pelo método hematoxilina-eosina (HE). A artrite na ATM foi induzida através da administração de 40µL de Zy 2 mg/i.art.. O grupo controle (C) recebeu 40µL solução salina i.art. Os animais foram sacrificados nos tempos 6 h, 10 d e 21 d após indução da artrite, e suas ATMs esquerdas removidas e processadas para coloração pelo método HE. (A): ATM de animais normais, sem artrite. (B): ATM de animais com artrite aguda sacrificados na 6^a h após indução da artrite mostrando infiltrado celular inflamatório na membrana sinovial (MS), no tecido conjuntivo periarticular, no tecido muscular esquelético e espessamento da MS. (C): ATM de animais com artrite crônica sacrificados no 10^o d após indução da artrite mostrando infiltrado celular inflamatório na MS, no tecido conjuntivo periarticular, no tecido muscular esquelético, espessamento e fibrose da MS. (D): ATM de animais com artrite crônica sacrificados no 21^o d após indução da artrite mostrando infiltrado celular inflamatório na membrana sinovial, aumento do espessamento e da fibrose na MS. Aumento de 40x. C: cômulo; CA: cartilagem articular; DA: disco articular; MS: membrana sinovial; TPA: tecido periarticular; TME: tecido muscular esquelético.

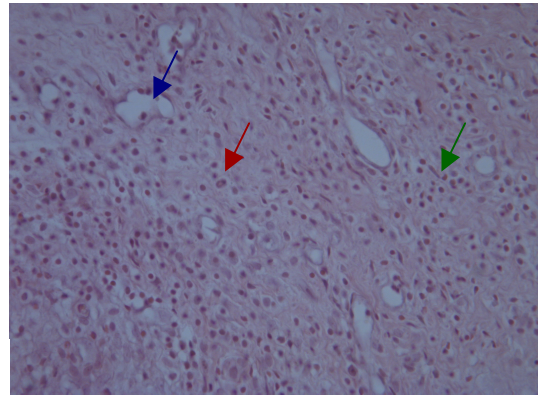
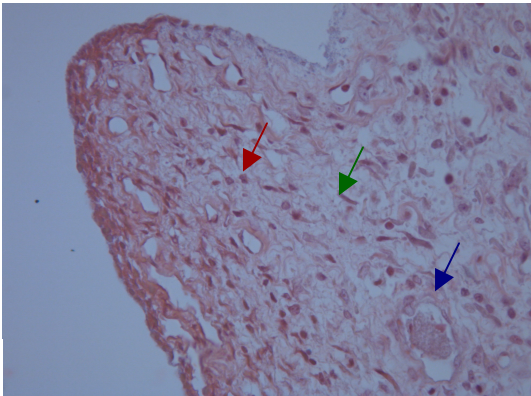
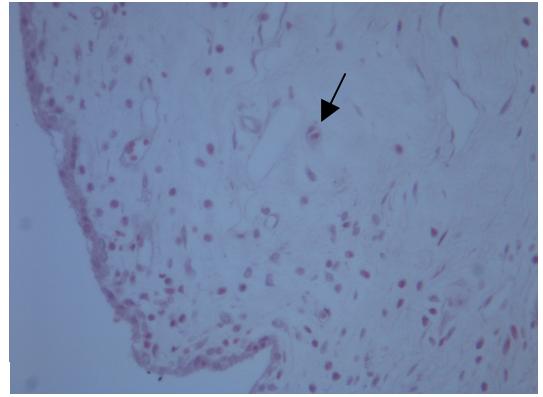
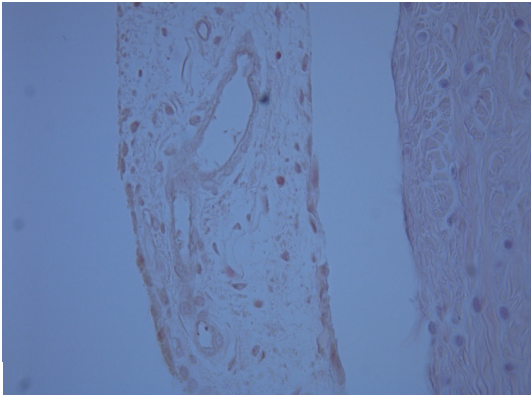
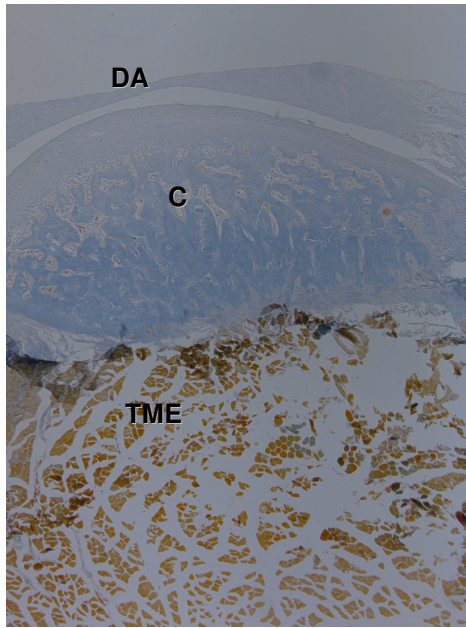
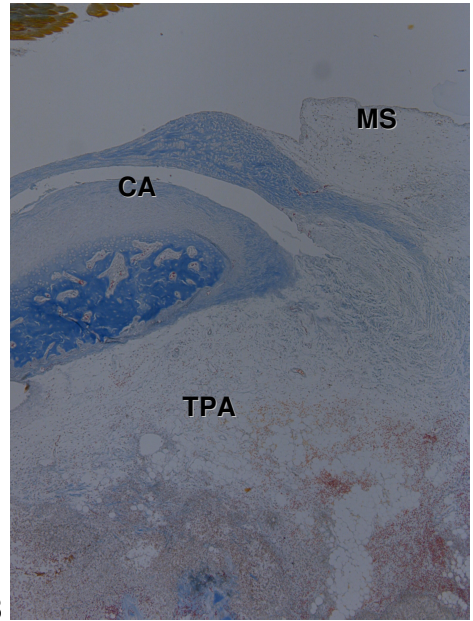


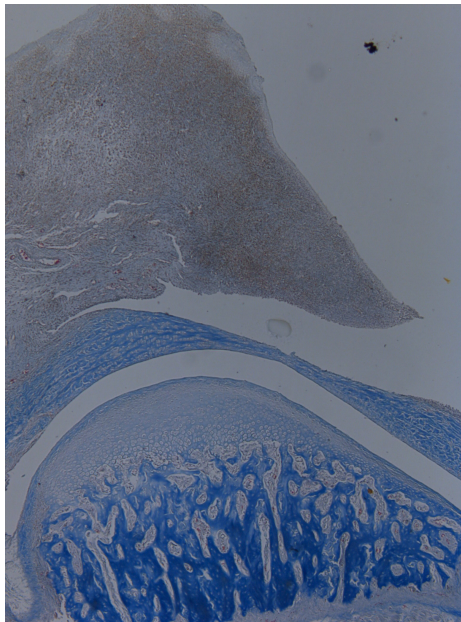
Figura 8. Fotomicrografias da membrana sinovial da ATM de ratos normais, de animais submetidos à artrite por Zy agudo (6 h) e crônico (10 e 21 d) obtidos através da coloração pelo método hematoxilina-eosina (HE). A artrite na ATM foi induzida através da administração de 40µL de Zy 2 mg/i.art.. O grupo controle (C) recebeu 40µL solução salina i.art. Os animais foram sacrificados nos tempos 6 h, 10 d e 21 d após indução da artrite, e suas ATMs esquerdas removidas e processadas para coloração pelo método HE. (A): ATM de animais normais, sem artrite. (B): ATM de animais com artrite aguda sacrificados na 6^a h após indução da artrite mostrando edema e infiltrado celular inflamatório com predominância de polimorfonucleares. (C): ATM de animais com artrite crônica sacrificados no 10^o d após indução da artrite mostrando fibrose, neovascularização e infiltrado celular inflamatório com predominância de monoculares. (D): ATM de animais com artrite crônica sacrificados no 21^o d após indução da artrite mostrando infiltrado celular inflamatório com predominância de monoculares e aumento da fibrose e dos fibroblastos. Aumento de 400x. seta preta: células polimorfonucleares; seta vermelha: células mononucleares; seta azul: microcirculação; seta verde: fibroblastos.



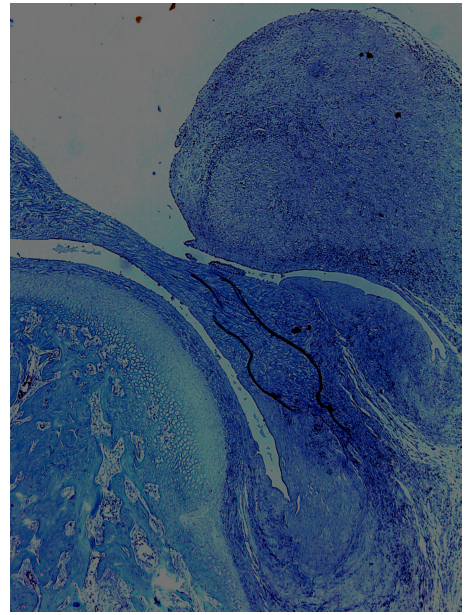
A



B



C



D

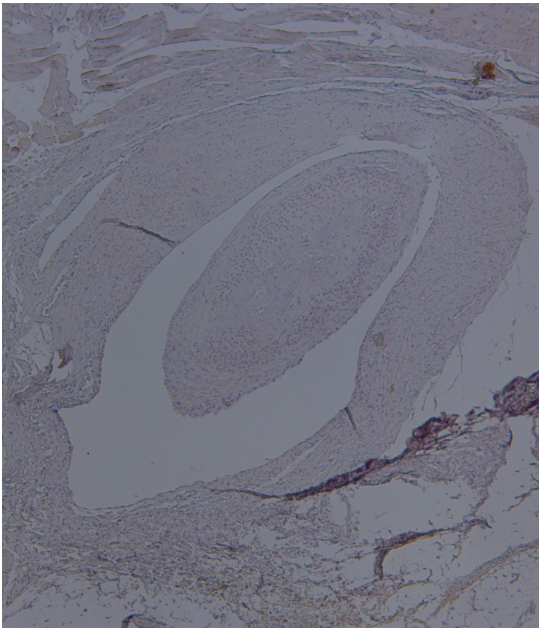
Figura 9. Fotomicrografias de ATMs de ratos normais, de animais submetidos à artrite por Zy agudo (6 h) e crônico (10 e 21 d) obtidos através da coloração pelo método tricrômio de Mallory (TM). A artrite na ATM foi induzida através da administração de 40µL de Zy 2 mg/i.art.. O grupo controle (C) recebeu 40µL solução salina i.art. Os animais foram sacrificados nos tempos 6 h, 10 d e 21 d após indução da artrite, e suas ATMs esquerdas removidas e processadas para coloração pelo método TM. (A): ATM de animais normais, sem artrite. (B): ATM de animais com artrite aguda sacrificados na 6^a h após indução da artrite. (C): ATM de animais com artrite crônica sacrificados no 10^o d após indução da artrite mostrando fibrose do disco articular e início de fibrose na membrana sinovial, na cartilagem articular e no tecido periarticular. (D): ATM de animais com artrite crônica sacrificados no 21^o d após indução da artrite mostrando intensa fibrose do disco articular, da membrana sinovial, da cartilagem articular e do tecido periarticular. Aumento de 40x.

apenas a fibrose do disco articular. No 21º d após indução da artrite, observa-se aumento da fibrose da membrana sinovial, da cartilagem articular, do tecido periarticular e do disco articular. Esses achados podem ser vistos através de fotomicrografias da ATM (**figura 9**).

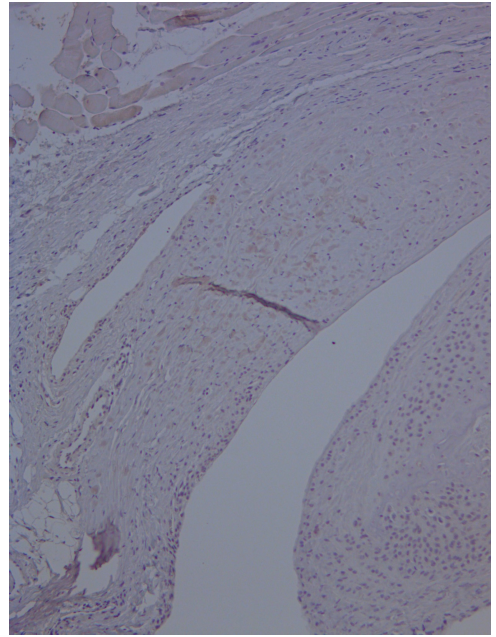
1.7. Estudo da reação de imunohistoquímica para NOSi

O estudo da reação da expressão por imunohistoquímica de NOSi na ATM na 6ª hora após indução da artrite por Zy mostrou aumento da expressão de NOSi nos cortes da ATM de animais com artrite em relação aos animais sem artrite. Em animais sem artrite na ATM já se observa marcação celular para a enzima NOSi, sendo esta marcação mais acentuada nos animais com artrite na ATM induzida por Zy. Os tipos celulares que apresentaram marcação para NOSi, ou seja, os tipos celulares que expressaram a enzima indutiva, foram os condrócitos do disco articular e da cartilagem articular e as células sinoviais. As fotomicrografias mostram ATM de animais sem artrite na ATM (A e B), ATM de animais definidas como controle negativo, que são animais submetidos à artrite sem incubação das lâminas com anticorpo anti-NOSi (C e D), e ATM de animais submetidos à artrite na ATM cujas lâminas foram incubadas com anticorpo anti-NOSi (E e F) e, portanto, apresentam a coloração marrom característica das células marcadas através da reação de imunohistoquímica para NOSi (**figura 10**).

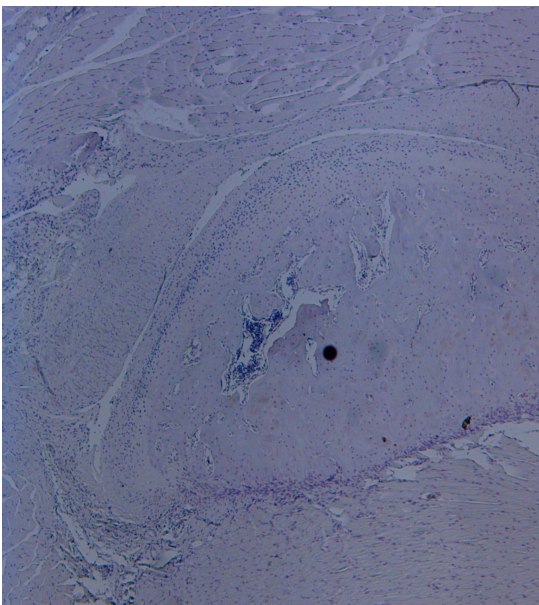
A



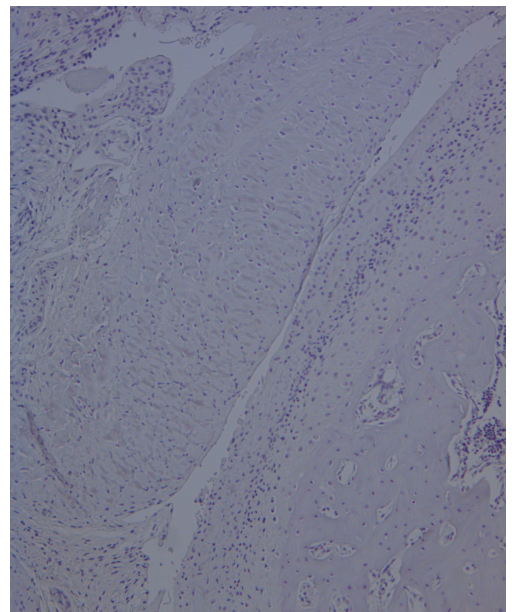
B



C



D



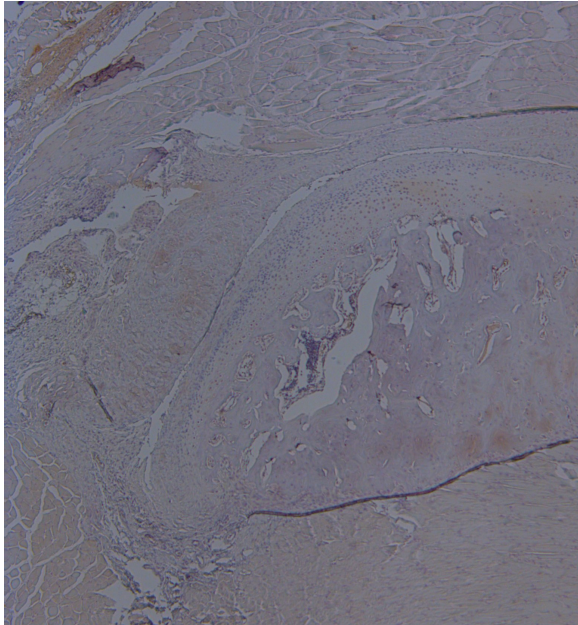
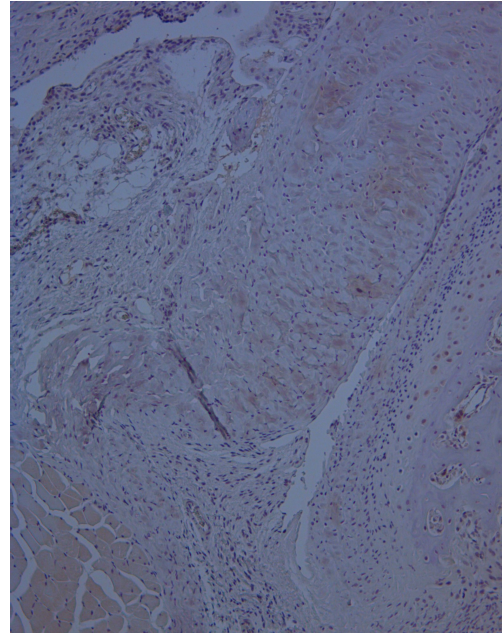
E**F**

Figura 10. Fotomicrografias de ATMs de ratos normais e de animais submetidos à artrite por zymosan (Zy) agudo (6 h) obtidas após reação de imunohistoquímica para NOSi. (A e B): ATM de animais sem artrite na ATM (aumento 40x e 100x, respectivamente) mostrando marcação de condrócitos e de células sinoviais. (C e D): controle negativo (cortes que não foram incubados com anticorpo anti-NOSi) - ATM de animais com artrite induzida por Zy (aumento 40x e 100x, respectivamente) não apresentando marcação para NOSi . (E e F): ATM de animais com artrite induzida por Zy (aumento 40x e 100x, respectivamente) mostrando notório aumento de imunomarcação para NOSi em condrócitos e sinoviócitos.

2. Efeito da administração de inibidores da síntese de óxido nítrico

2.1 Efeito do L-NAME e do 1400W sobre o influxo celular no líquido sinovial

A administração de L-NAME (100 mg/kg) e de 1400W (1 mg/kg) reduziu de forma significativa ($p < 0,05$) a contagem do número de células do líquido sinovial na 6ª hora após a indução da artrite na ATM quando comparado ao grupo não-tratado (NT) (**figura 11 e 12**). As demais doses não foram capazes de reduzir o influxo celular para o líquido sinovial articular de animais com artrite na ATM induzida por zymosan.

2.2 Efeito do L-NAME e do 1400W sobre extravasamento de azul de Evans / Análise da permeabilidade vascular

À análise da permeabilidade vascular, observou-se que a administração de L-NAME (100 mg/kg) e de 1400W (1 mg/kg) reduziu de forma significativa ($p < 0,05$) o extravasamento de azul de Evans na 6ª h após indução da artrite por zymosan quando comparado ao grupo não-tratado (NT), achado que está de acordo com a redução do infiltrado celular proporcionado pela administração dessas mesmas drogas (**figura 13**).

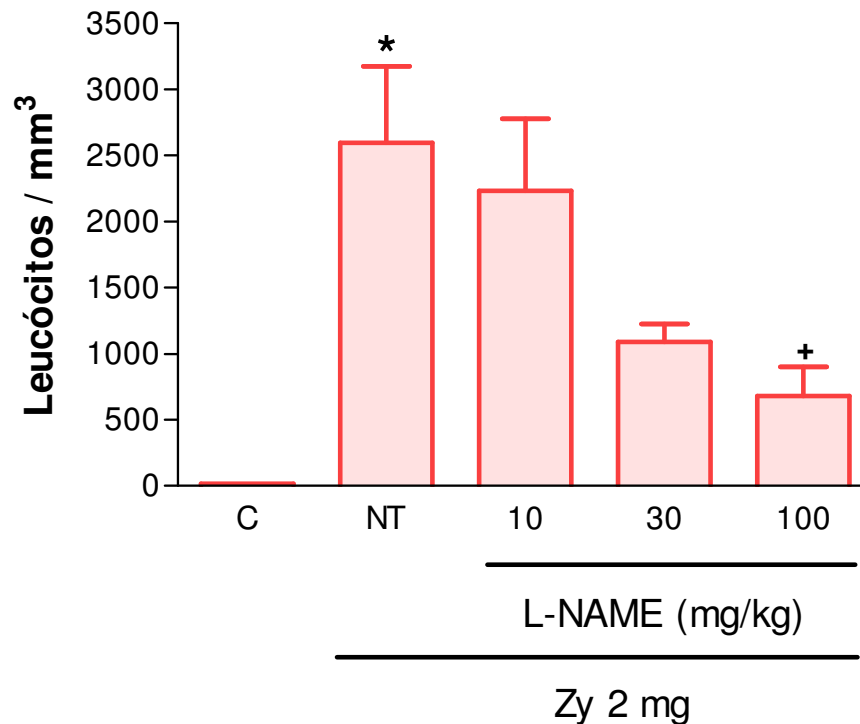


Figura 11. Efeito da administração de L-NAME sobre influxo celular no líquido sinovial na artrite da ATM de ratos induzida por zymosan (Zy). A artrite na ATM foi induzida através da administração de 40 μ L de Zy 2 mg/i.art.. O grupo controle (C) recebeu 40 μ L solução salina i.art. O grupo não-tratado (NT) representa animais com artrite que receberam salina i.p.. L-NAME nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg (i.p.) foi administrado 30 min antes da indução da artrite na ATM. A contagem de células no líquido articular foi registrada na 6^a h. L-NAME 100 mg/kg foi capaz de reduzir o aumento do influxo celular no líquido sinovial articular. Os dados representam uma média \pm epm (n=6). * p <0,05 em relação ao grupo controle (C), + p <0,05 em relação ao grupo não-tratado (NT). (ANOVA, Bonferroni).

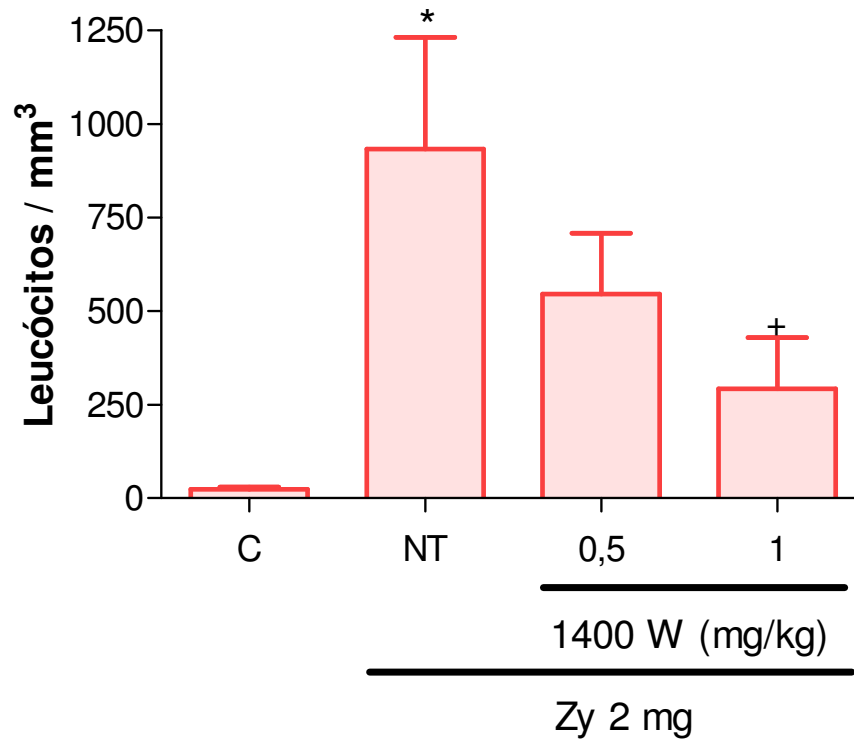


Figura 12. Efeito da administração de 1400 W sobre influxo celular no líquido sinovial na artrite da ATM de ratos induzida por zymosan (Zy). A artrite na ATM foi induzida através da administração de 40 μ L de Zy 2 mg/i.art.. O grupo controle (C) recebeu 40 μ L solução salina i.art. O grupo não-tratado (NT) representa animais com artrite que receberam salina s.c.. 1400 W nas doses de 0,5 e 1 mg/kg (s.c.) foi administrado 30 min antes da indução de artrite na ATM. A contagem de células no líquido articular foi registrada na 6^a h. 1400 W 1 mg/kg foi capaz de reduzir o aumento do influxo celular no líquido sinovial articular. Os dados representam uma média \pm epm (n=6). * p <0,05 em relação ao grupo controle (C), ⁺ p <0,05 em relação ao grupo não-tratado (NT). (ANOVA, Bonferroni).

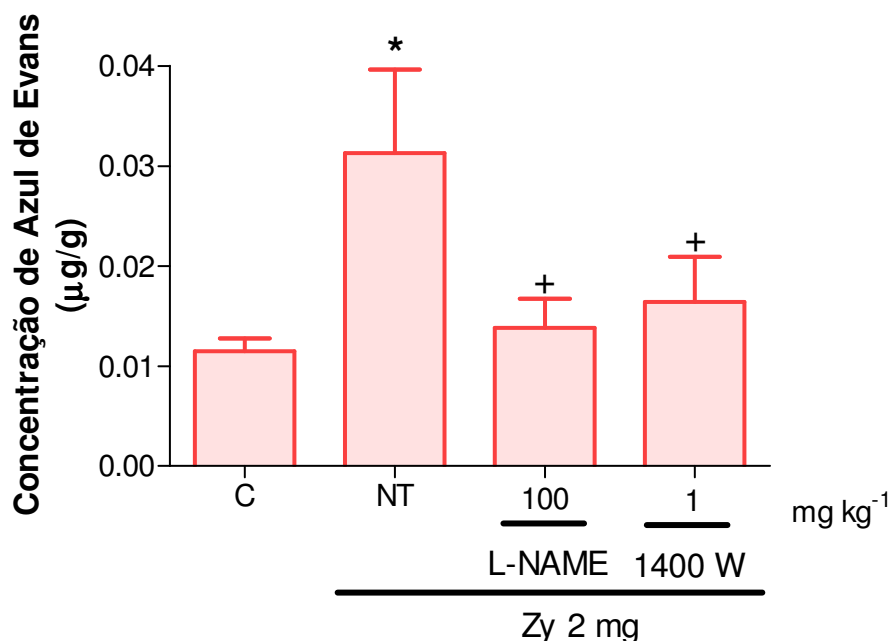


Figura 13. Efeito da administração de L-NAME e de 1400 W sobre concentração de Azul de Evans na artrite da ATM de ratos induzida por zymosan. A artrite na ATM foi induzida através da administração de 40 µL de Zy 2 mg/i.art.. O grupo controle (C) recebeu 40 µL solução salina i.art. O grupo não-tratado (NT) representa animais com artrite que receberam salina i.p ou s.c.. L-NAME 100 mg/kg (i.p.) ou 1400 W 1 mg/kg (s.c.) foram administrados 30 min antes da indução de artrite na ATM. Os animais foram sacrificados na 6ª h após indução da artrite, e sua ATM esquerda retirada para análise da concentração de Azul de Evans. L-NAME 100 mg/kg e 1400 W 1 mg/kg foram capazes de reduzir o aumento do extravasamento de Azul de Evans induzido por Zy. Os dados representam uma média ± epm (n=6). * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (C), + $p < 0,05$ em relação ao grupo não-tratado (NT). (ANOVA, Bonferroni).

2.3 Efeito do L-NAME e do 1400W sobre análise histopatológica

A tabela 3 mostra o efeito da administração de L-NAME (100 mg/kg, i.p.) e de 1400W (1 mg/kg, s.c.) sobre as alterações histopatológicas da artrite na ATM, através da coloração hematoxilina-eosina. Tanto L-NAME quanto 1400W foram capazes de reverter o quadro inflamatório na ATM de ratos na 6^a h após indução da artrite por Zy de forma significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo não-tratado (NT). Nos grupos tratados com L-NAME ou 1400W, podemos observar redução dos parâmetros em nível de normalidade, assemelhando-se ao grupo controle (C), com redução do infiltrado celular na membrana sinovial (MS), no tecido conjuntivo periarticular, no tecido muscular esquelético e do espessamento da MS. Esses achados podem ser vistos através de fotomicrografias da ATM (**figura 14**).

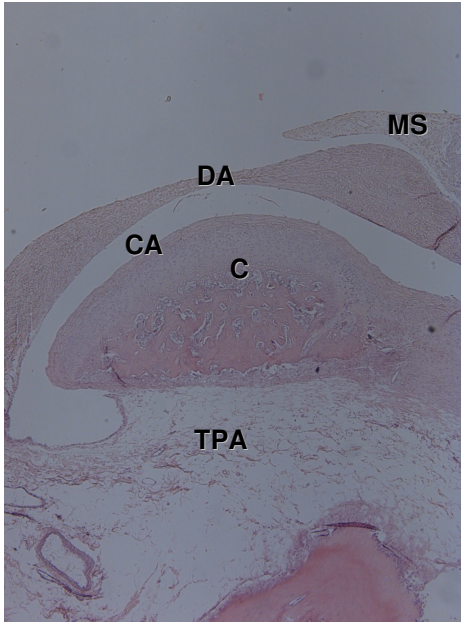
2.4 Efeito do L-NAME e do 1400W sobre a reação de imunohistoquímica para NOSi

Observou-se diferença quanto à expressão da enzima NOSi em condrócitos do disco articular e da cartilagem articular e em sinoviócitos entre os animais com artrite na ATM induzida por Zy e os animais com artrite nos quais foram administrados L-NAME (100 mg/kg, i.p.) ou 1400W (1 mg/kg, s.c.). Nos animais tratados com L-NAME, houve redução da expressão da enzima NOSi, sendo esta redução mais evidente nos animais nos quais se administrou 1400 W, visto este ser inibidor seletivo para NOSi (**figura 15**).

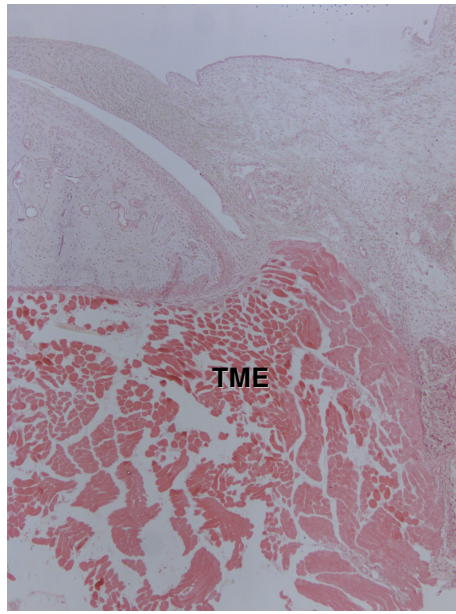
Tabela 3. Efeito da administração de L-NAME e de 1400W sobre análise histopatológica da artrite na ATM de ratos induzida por zymosan através da coloração pelo método HE.

	Infiltrado celular MS	Espessamento MS	Infiltrado celular tec periarticular	Infiltrado celular tec muscular	Fibrose MS
C	0(0-0)	0(0-0)	0(0-0)	0(0-0)	0(0-0)
NT	2,5 (1-3)*	3 (0-3)*	4 (4-4)*	3 (2-4)*	0(0-0)
L-NAME	0,5 (0-1)+	0 (0-0)+	1 (0-2)+	0 (0-0)+	0 (0-0)
1400 W	0 (0-0)+	0 (0-0)+	1 (0-2)+	0 (0-0)+	0 (0-0)

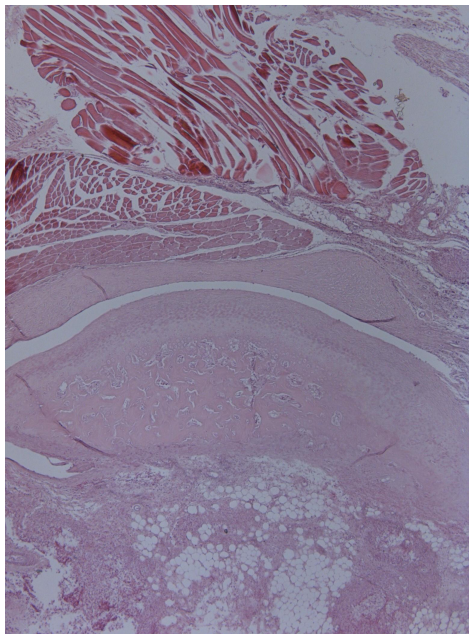
A artrite na ATM foi induzida através da administração de 40µL de Zy 2 mg/i.art.. O grupo controle (C) recebeu 40µL solução salina i.art.. O grupo não-tratado (NT) representa animais com artrite que receberam salina i.p ou s.c.. L-NAME 100 mg/kg (i.p.) ou 1400 W 1 mg/kg (s.c.) foram administrados 30 min antes da indução de artrite na ATM. Os animais foram sacrificados na 6ª h após indução da artrite, e suas ATMs esquerdas removidas para realização de cortes seriados, processados para coloração pelo método HE. L-NAME 100 mg/kg e 1400 W 1 mg/kg foram capazes de reverter o quadro inflamatório na ATM de ratos com artrite. Os dados representam Mediana e variação de pelo menos 5 animais, em que foram considerados para análise os seguintes parâmetros: infiltrado celular inflamatório na membrana sinovial (MS), espessamento da MS, influxo celular inflamatório para o tecido periarticular, influxo celular inflamatório no tecido muscular esquelético e fibrose da MS. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (C). + $p < 0,05$ em relação ao grupo não-tratado (NT) (Kruskal-Wallis, Dunn's).



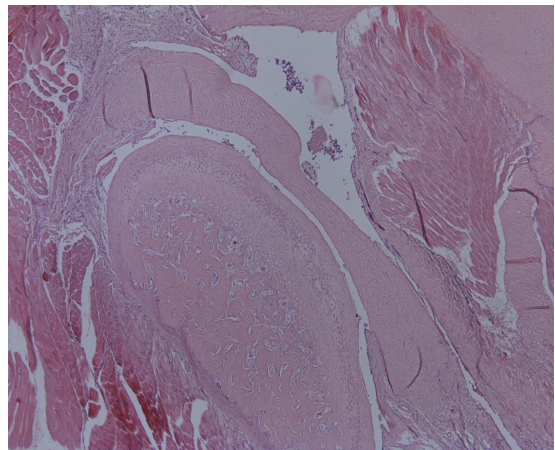
A



B



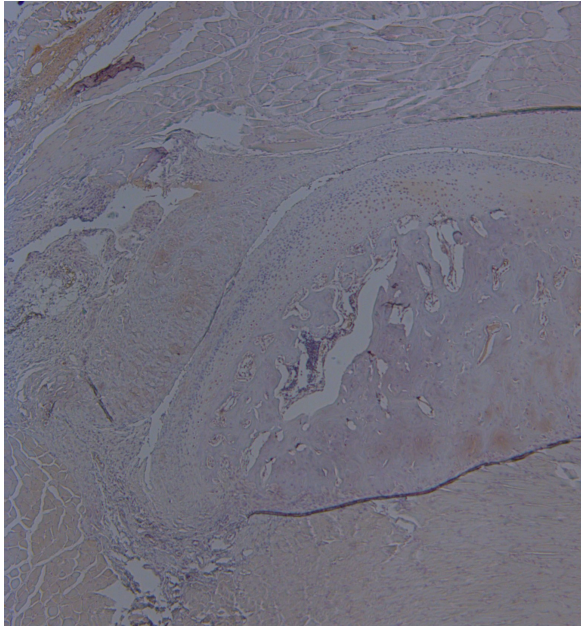
C



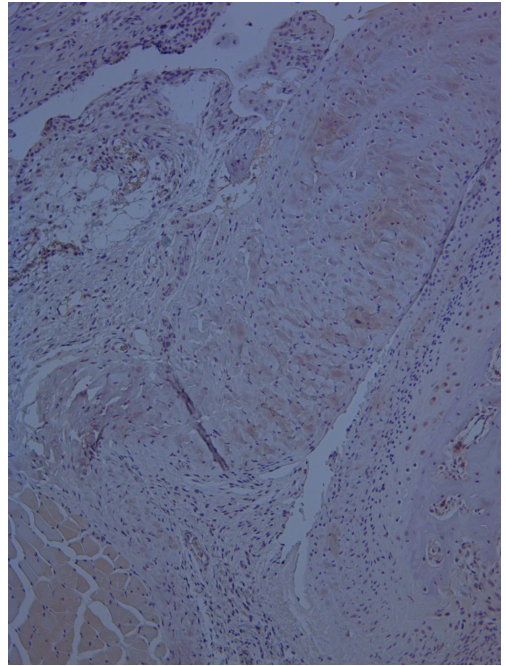
D

Figura 14. Fotomicrografias de ATMs de ratos normais, de animais submetidos à artrite aguda por zymosan (Zy) (6 h) e com administração de L-NAME e de 1400W obtidos através da coloração pelo método hematoxilina-eosina (HE). A artrite na ATM foi induzida através da administração de 40µL de Zy 2 mg/i.art.. O grupo controle (C) recebeu 40µL solução salina i.art.. L-NAME 100 mg/kg (i.p.) ou 1400 W 1 mg/kg (s.c.) foram administrados 30 min antes da indução de artrite na ATM. Os animais foram sacrificados na 6ª h após indução da artrite, e suas ATMs esquerdas removidas para realização de cortes seriados, processados para coloração pelo método HE. (A): ATM de animais normais, sem artrite. (B): ATM de animais com artrite aguda sacrificados na 6ª h após indução da artrite mostrando infiltrado celular inflamatório na membrana sinovial (MS), no tecido conjuntivo periarticular, no tecido muscular esquelético e espessamento da MS. (C): ATM de animais com artrite que receberam L-NAME, mostrando ausência de infiltrado celular inflamatório no tecido muscular esquelético e de espessamento da MS, e leve influxo celular inflamatório para MS e para o tecido periarticular. (D): ATM de animais com artrite que receberam 1400 W, mostrando ausência de infiltrado celular inflamatório na membrana sinovial (MS), de espessamento da MS, de influxo celular inflamatório no tecido muscular esquelético e de fibrose da MS, e leve influxo celular inflamatório para o tecido periarticular. Aumento de 40x. C: côndilo; CA: cartilagem articular; DA: disco articular; MS: membrana sinovial; TPA: tecido periarticular; TME: tecido muscular esquelético.

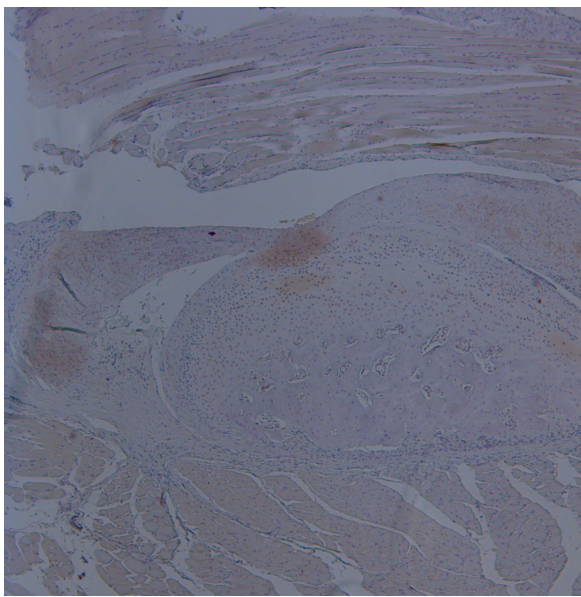
A



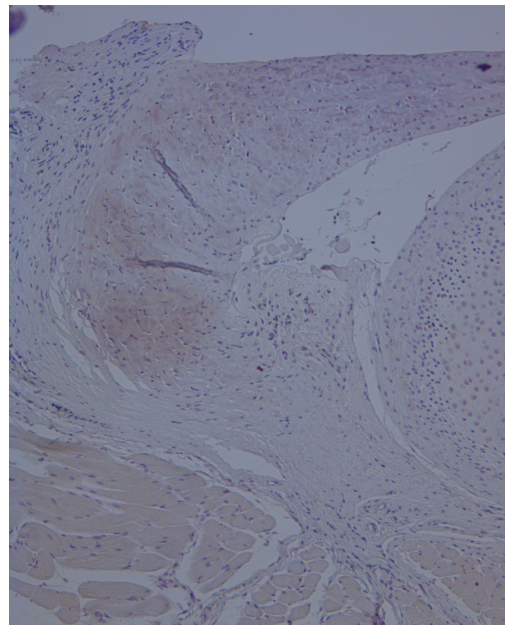
B



C



D



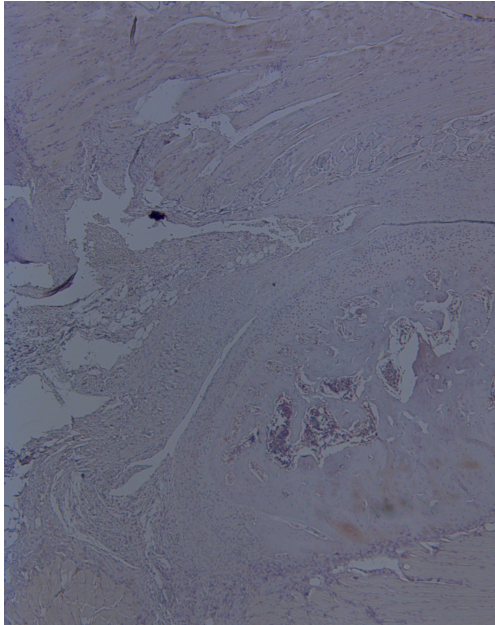
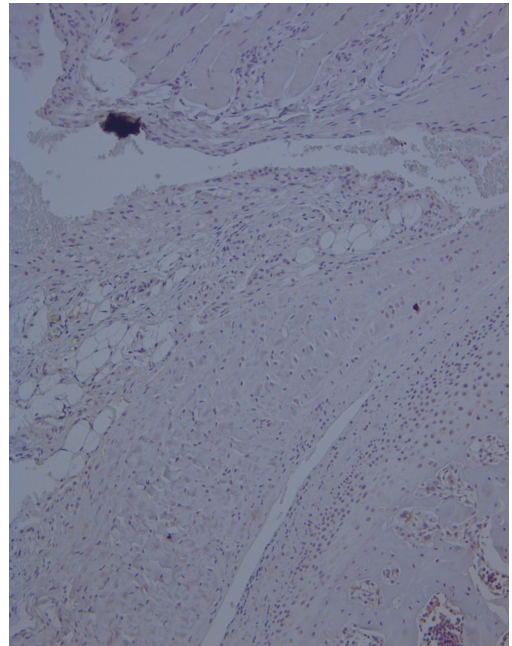
E**F**

Figura 15. Fotomicrografias de ATMs de ratos submetidos à artrite aguda por zymosan (Zy) (6 h) e com administração de L-NAME e de 1400W obtidas pela reação de imunohistoquímica para NOSi. (A e B): ATM de animais com artrite induzida por Zy (aumento 40x e 100x, respectivamente) mostrando imunomarcagem para NOSi em condrócitos e sinoviócitos. (C e D): ATM de animais com artrite que receberam L-NAME, mostrando redução da expressão da enzima NOSi (aumento 40x e 100x, respectivamente). (E e F): ATM de animais com artrite que receberam 1400 W, mostrando mais evidente redução da expressão da enzima NOSi (aumento 40x e 100x, respectivamente).

V. DISCUSSÃO

V. DISCUSSÃO

Neste trabalho, propomo-nos, inicialmente, montar um modelo experimental que se prestasse ao estudo das alterações inflamatórias na articulação temporomandibular. Desenvolvemos, então, um modelo de artrite na ATM induzida por zymosan, inédito na literatura, desenvolvido anteriormente na articulação de joelhos de ratos (ROCHA *et al.*, 1999). Investigamos, neste modelo experimental, a migração celular e as alterações histopatológicas, tanto na fase aguda quanto na fase crônica. Avaliamos, também, a possível participação do NO nesses eventos através da análise da liberação de nitrito/nitrato no lavado articular e da presença de NOSi detectada através de imunohistoquímica, assim como os efeitos dos inibidores da NOS.

Sabe-se que a articulação temporomandibular de ratos apresenta semelhanças com a articulação de humanos, comprovada através de análises histopatológica, histoquímica e imunohistoquímica, podendo, portanto, ser utilizada em estudos experimentais. Para desenvolver o modelo experimental, utilizamos animais com peso entre 160 e 220 g, o que corresponde à idade dos animais em torno de 8 semanas, visto já ter sido mostrado na literatura que a maturidade da ATM em ratos ocorre com 2 meses de idade (FURSTMAN, 1964; FUJITA & HOSHINO, 1989; NOZAWA-INOUE *et al.*, 2003).

Muitos estudos clínicos e investigações epidemiológicas têm mostrado uma maior prevalência para o sexo feminino no acometimento de DTM. Este fato é discutido na literatura provavelmente devido à presença de receptores de estrógeno nos tecidos articulares, apresentando os sinoviócitos tipo B (fibroblastos-símile) e condrócitos como alvos, ao papel do estrógeno no catabolismo da matriz cartilaginosa, além de haver aumento na sensibilidade de receptores de aminoácidos excitatórios na musculatura facial de fêmeas (ABUBAKER *et al.*, 1993; WÄNMAN, 1996; KAPILA & XIE, 1998; KAMISAKA *et al.*, 2000; CAIRNS *et al.*, 2001; YAMADA *et al.*, 2003). Devido a estes fatos, decidimos utilizar ratos fêmeas em nossos experimentos.

Na artrite em joelho de ratos induzida por zymosan, Rocha *et al.* (1999) utilizaram Zy 1 mg para induzir a doença. Nossos resultados mostraram, entretanto, que apenas Zy na dose de 2 mg foi capaz de induzir a artrite na ATM dos animais.

Zamma, em 1983, já discutia as diferenças entre as articulações de joelho e a ATM, relatando que na ATM existe maior número de camadas de estruturas de fibras colágenas na zona transicional da cartilagem articular comparada à articulação de joelho, propondo uma razão pela qual a indução da artrite na ATM é mais difícil de ser conseguida, afirmativa esta que foi ratificada posteriormente por Nozawa-Inoue *et al.* (1998, 2003).

Para estudar migração celular utilizamos os parâmetros contagem do número de leucócitos totais no líquido sinovial e ensaio de mieloperoxidase (MPO). A cinética do influxo celular, através da contagem do número de leucócitos totais no líquido sinovial, mostrou aumento significativo do número total de células no lavado articular em ATM com artrite quando comparado ao grupo controle, apresentando pico na 6ª hora, achado que se manteve significativo até 2 dias após indução da artrite.

Nenhum trabalho anteriormente realizou contagem do influxo celular no líquido sinovial da ATM de ratos; parâmetro que foi utilizado e que correspondeu aos nossos achados na artrite induzida por antígeno em coelhos (DE BRUM-FERNANDES *et al.*, 1992), na artrite induzida por imunocomplexo (ROCHA *et al.*, 1996) e por Zy em joelhos de ratos (BEZERRA, 2002).

Uma vez que há grande influxo de leucócitos na fase aguda da artrite induzida por Zy, supõe-se que estes leucócitos sejam predominantemente neutrófilos. Ratificando essa hipótese, a dosagem da atividade de mieloperoxidase (MPO) (enzima presente nos grânulos azurófilos de neutrófilos) nos tecidos articulares encontrou-se aumentada na 6ª hora após indução da artrite na ATM por Zy. Na artrite induzida por Zy em articulação de joelhos de ratos, a atividade de MPO também se mostrou elevada (BEZERRA, 2002). Foi ainda documentada a presença de MPO no líquido sinovial de pacientes com artrite reumatóide e de pacientes com desarranjos internos articulares na ATM (EDWARDS *et al.*, 1988; ARINCI *et al.*, 2005).

Medida do extravasamento de azul de Evans é um método visual e quantitativo seguro para se estudar inflamação, visto que azul de Evans se liga a proteínas plasmáticas. Sabe-se que um dos cinco pontos clássicos da inflamação é o edema causado pelo aumento da permeabilidade vascular e subsequente extravasamento plasmático de fluidos e de proteínas. Portanto, durante inflamação, há extravasamento do azul de Evans ligados a proteínas plasmáticas que pode ser

mensurado quantitativamente (HAAS *et al.*, 1992; ROBBINS, 2002). Haas *et al.* (1992) e Fiorentino *et al.* (1999) descreveram anteriormente o uso da medida do extravasamento de azul de Evans em ATM de ratos nos quais foi aplicado óleo de mostarda, e mostraram que na fase sub-aguda, 30 min após indução da artrite, houve pico de extravasamento plasmático. Nosso trabalho é o primeiro a mostrar o extravasamento de azul de Evans na ATM na fase aguda e mesmo após 24 h, visto que o extravasamento plasmático apresentou pico na 6^a h após indução da artrite por Zy e se manteve durante as primeiras 24 h.

Prosseguindo no estudo desse modelo, analisamos as alterações histopatológicas observadas após a indução da artrite na ATM por Zy em ratos. Nosso trabalho é o primeiro a relacionar parâmetros inflamatórios histopatológicos agudos e crônicos envolvendo as estruturas articulares e periarticulares, ressaltando que outros estudos mostraram histopatologia da ATM sem, entretanto, atribuir escores para análise estatística de todas essas estruturas (ZAMMA, 1983; HAAS *et al.*, 1992; FUJITA & HOSHINO, 1989; GOULART *et al.*, 2005).

O presente trabalho mostrou que a injeção de Zy 2 mg na ATM de ratos foi capaz de induzir reação inflamatória nos tecidos articulares e periarticulares. Na fase aguda, ou seja, na 6^a hora após indução da artrite, observou-se infiltrado celular na membrana sinovial (MS), no tecido conjuntivo periarticular e no tecido muscular esquelético, sendo caracterizado predominantemente por células polimorfonucleares, e já se observou espessamento da MS. Corroborando com os achados de aumento da permeabilidade vascular através do aumento do extravasamento de azul de Evans, observamos também na histopatologia a presença de edema na MS. Em concordância com nossos achados, Haas *et al.* (1992) havia mostrado a presença de neutrófilos na fase aguda da inflamação na ATM induzida por óleo de mostarda. Goulart *et al.* (2005), entretanto, mostraram que hiperplasia da membrana sinovial na artrite da ATM induzida por carragenina e por fomalina só foi observada após 3 dias de indução da artrite, evidenciando curso diferente na progressão da doença dependente do estímulo inflamatório aplicado.

Na fase crônica da artrite na ATM induzida por Zy, 10^o e 21^o dias após indução da artrite, observamos perpetuação dos parâmetros de infiltração celular, sendo os tipos celulares predominantes mononucleares, e de hiperplasia da MS. No 21^o dia após indução da artrite, entretanto, o infiltrado celular no tecido conjuntivo periarticular e no tecido muscular esquelético foi reduzido. Neste momento

observou-se fibrose acentuada dos tecidos articulares e periarticulares, mostrando a tentativa dos tecidos em realizar sua reestruturação, porém de maneira desorganizada, causando perpetuação do processo inflamatório com formação de fibrose e, possivelmente, posterior perda da função e degradação das estruturas articulares. Zamma (1983) mostrou a presença de degeneração da cartilagem articular e do osso subcondral na artrite da ATM induzida pela inoculação intradérmica de CFA na escápula parietal de ratos, assim como formação de aderências, na 5ª semana após indução da artrite. Nosso trabalho não foi desenvolvido até a fase em que se pudessem observar alterações degenerativas nos tecidos articulares. Podemos inferir, entretanto, que a continuação das observações histopatológicas em nosso modelo experimental levaria a alterações degenerativas nos tecidos articulares, pois, segundo Yamaza *et al.* (2004), hiperplasia sinovial já é um indício de doença degenerativa na ATM.

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

A disfunção temporomandibular é uma patologia complexa inferindo uma importante condição dolorosa ao paciente podendo resultar, cronicamente, em dor crônica, destruição das estruturas articulares e, em consequência, limitação de toda a função do sistema estomatognático. Foi demonstrada a presença de diversos mediadores inflamatórios em seus mecanismos fisiopatológicos.

Foi descrita também a participação de espécies reativas de oxigênio (ROS) na progressão da artrite nas DTMs (KAWAI *et al.*, 2000). Sabe-se que ROS causam danos diretos em células, tecidos, vasos sanguíneos, e estimulam fatores de transcrição como fator de transcrição nuclear- κ B (NF- κ B). Uma vez ativado, NF- κ B leva a uma “up-regulation” de muitos genes, incluindo aqueles que resultam na produção de mediadores inflamatórias, relatado anteriormente como importantes na fisiopatologia das DTMs (HALL *et al.*, 1995; KRENGER & FERRARA, 1996; SONNIS *et al.*, 2000).

Em trabalho de revisão de literatura, Chaves *et al.* (2005) sugeriram, baseados em seus dados e em dados da literatura, uma cascata de eventos envolvendo mediadores inflamatórios, enzimas condrolíticas e proteolíticas, células articulares e inflamatórias e terminal nervoso nociceptivo que caracterizam a evolução do quadro inflamatório articular na ATM (Anexo 1, figura 1). É sabido que a produção desses mediadores supracitados é capaz de desencadear a estimulação dos mesmos tipos celulares que os produziram a sintetizarem outros mediadores como óxido nítrico, mediador inflamatório estudado em nosso trabalho, e este, por sua vez, também é capaz de mediar atividade de alguns tipos celulares a produzirem outros mediadores como citocinas, prostaglandinas e enzimas que participam dos eventos inflamatórios e destrutivos articulares (AMIN & ABRAMSON, 1998).

Para estudar a participação do NO na artrite induzida por Zy, utilizamos a análise da liberação de nitrito/nitrato no lavado articular e da presença de NOSi detectada através de imunohistoquímica.

Existem evidências do envolvimento do NO em diversas funções fisiológicas, assim como em condições patológicas como na periodontite (LEITÃO *et al.*, 2004, 2005), na cistite hemorrágica (SOUZA-FILHO *et al.*, 1997) e na artrite reumatóide e osteoartrite (FARRELL *et al.*, 1992; STICHTENOTH *et al.*, 1995; UEKI *et al.*, 1996; McINNIS *et al.*, 1996; GRABOWSKI *et al.*, 1997; HILLIQUIN *et al.*, 1997). Também foi demonstrada a participação do NO em pacientes com dor articular, sinovite,

desarranjos internos articulares e osteoartrite nas DTMs (TAKAHASHI *et al.*, 1996, 1999, 2003; SUENAGA *et al.*, 2000; HOMMA *et al.*, 2001; NAGAI *et al.*, 2003; YAMAZA *et al.*, 2003, 2004).

Nosso modelo experimental ratifica os achados da literatura, pois mostrou que Zy 2 mg foi capaz de induzir aumento da concentração de nitrito/nitrato (produto da degradação do NO) no lavado articular de ratos com artrite na ATM na fase aguda da inflamação. Outros trabalhos mostraram aumento dos níveis de nitrito induzido por Zy em modelos de peritonite em camundongos (AJUEBOR *et al.*, 1998) e em artrite no joelho (BEZERRA, 2002), este último mostrando que esse achado se perpetuou durante 21 dias, ou seja, até a fase crônica da artrite.

Esse aumento dos níveis de NO deve-se provavelmente a uma produção local desse mediador, pois o mesmo apresenta meia-vida curta e necessita, portanto, ser produzido localmente para exercer efeitos. Foi demonstrado que NO é produzido por diversos tipos celulares como células endoteliais (LAMAS *et al.*, 1992), macrófagos (DI ROSA *et al.*, 1990), neutrófilos (WRIGHT *et al.* 1989), fibroblastos (WERNER-FELMAYER *et al.*, 1990), osteoblastos e osteoclastos (EVANS & RALSTON, 1996), células neuronais (KNOWLES *et al.*, 1989), sinoviócitos (MCINNES *et al.*, 1996) e condrócitos (STADLER *et al.*, 1991).

As possíveis fontes de NO nos sítios inflamatórios articulares ainda causam divergências entre autores, mas se sabe que uma grande variedade de células pode expressar NOSi após exposição a estímulos inflamatórios. Nossos resultados evidenciaram, através da reação de imunoistoquímica para NOSi, a presença desta enzima em condrócitos e sinoviócitos na articulação temporomandibular de animais normais e aumento de sua expressão na articulação temporomandibular de animais com artrite na ATM. Outros autores já haviam mostrado a presença de NOSi em células sinoviais e vasculares na ATM de pacientes com sinovite, desarranjos internos articulares e osteoartrite (HOMMA *et al.*, 2001; TAKAHASHI *et al.*, 2003; NAGAI *et al.*, 2003; YAMAZA *et al.*, 2003).

Grabowski *et al.* (1996) afirmaram que células articulares como condrócitos, sinoviócitos e osteoblastos são capazes de produzir NO estimuladas por citocinas como IL-1 e TNF α , não acontecendo o mesmo com leucócitos. Outros autores, entretanto, afirmaram que leucócitos infiltrantes como neutrófilos e linfócitos, assim como mastócitos e macrófagos são capazes de gerar grandes quantidades de NO

(WEINBERG *et al.*, 1995; WHEELER *et al.*, 1997). Na artrite em joelho de ratos, Bezerra (2002) mostrou que uma das principais fontes de NO na articulação com artrite são os neutrófilos infiltrantes. Nosso estudo reitera essa afirmativa, sugerindo que tanto células articulares como condrócitos e sinoviócitos, quanto neutrófilos, principal leucócito encontrado na fase aguda da inflamação articular, são importantes fontes de NO articular nas DTMs.

Retomando o resultado descrito anteriormente, nosso trabalho mostrou a presença de NOSi em células articulares (condrócitos e sinoviócitos) de animais sem artrite na ATM. Masuda *et al.*, em 2002, haviam mostrado a presença de NOSi constitutivamente em células sinoviais tipo A (macrófagos-símile) e tipo B (fibroblastos-símile) também em ATMs normais, apesar de Grabowski *et al.* (1997), ressaltando que eles não avaliaram expressão da enzima na ATM, afirmarem que a expressão de NOSi se encontrava presente apenas em articulações com artrite. Apesar desse conflito de resultados, sugere-se a participação de NOSi na fisiologia da ATM provavelmente devido ao fato de ser esta uma articulação sujeita a contínuo estresse mecânico, havendo a necessidade de futuras pesquisas para elucidar o papel fisiológico desta enzima na ATM. Em outras regiões do organismo, como no sistema nervoso central, também já foi demonstrada a participação fisiológica da NOS induzida (SAHA & PAHAN; 2006; SEHARA *et al.*, 2006).

Dando continuidade à análise da participação do NO no modelo de artrite na ATM induzida por Zy, avaliamos o efeito da administração de inibidores da NOS sobre a permeabilidade vascular, a migração celular, a análise histopatológica e a imunoreatividade para NOSi. Vale ressaltar que nenhum outro trabalho utilizou como ferramenta farmacológica inibidores da síntese de NO em modelos de artrite na ATM.

Os resultados mostraram que tanto a administração de L-NAME (100 mg/kg) quanto de 1400W (1 mg/kg) 30 minutos antes da indução da artrite na ATM por Zy 2 mg reduziram a permeabilidade vascular, observada pela redução do extravasamento do azul de Evans, a migração celular, observado pela contagem do número de leucócitos totais no lavado articular e pela análise histopatológica, e reduziu a imunoreatividade para NOSi, todos esses eventos na 6^a h após indução da artrite.

Várias evidências sugerem o envolvimento do NO na permeabilidade vascular e na migração celular. Além dos efeitos vasodilatadores conhecidos do NO, foi demonstrada a presença de NOSi no músculo liso vascular sinovial, sugerindo a participação do NO na patogênese do aumento da permeabilidade vascular e do edema que acompanham a artrite (IGNARRO *et al.*, 1988; GRABOWSKI *et al.*, 1997).

O estudo histopatológico ratifica os resultados encontrados com a permeabilidade vascular e a migração celular, mostrando que tanto L-NAME quanto 1400W foram capazes de reverter o quadro inflamatório na ATM de ratos na 6ª h após indução da artrite por Zy. Pôde-se observar redução dos parâmetros em nível de normalidade do infiltrado celular inflamatório na membrana sinovial (MS), no tecido conjuntivo periarticular, no tecido muscular esquelético e do espessamento da MS. A descrição dessas alterações sugere um efeito antiinflamatório dos inibidores da NOS no modelo, promovendo redução do edema, do influxo celular e da hiperplasia sinovial.

Dados da literatura, em concordância com nossos achados, demonstram que inibidores da NOS ou camundongos knockout para o gene da NOSi apresenta redução da migração celular induzida por estafilococcus, lipopolissacarídeos da parede celular de estreptococcus, carragenina, antígeno ou zymosan (DE MELLO *et al.*, 1997; AJUEBOR *et al.*, 1998; CUZZOCREA *et al.*, 2000; FRANCO-PENTEADO *et al.*, 2001; BEZERRA, 2002). Em contrapartida, foi demonstrado que NO reduz a expressão de moléculas de adesão no endotélio vascular reduzindo, portanto, o influxo neutrofílico para os tecidos inflamados (KUBES *et al.*, 1991; PENG *et al.*, 1998; DAL SECCO *et al.*, 2003). Essa contradição está relacionada provavelmente à concentração do NO nos tecidos, ou seja, baixas concentrações de NO (através da enzima NOS constitutiva ou indutiva) atua constitutivamente inibindo adesão neutrofílica às células endoteliais (HICKEY & KUBES, 1997; HICKEY *et al.*, 1997), enquanto níveis elevados de NO produzidos na fase aguda da inflamação aumenta infiltração neutrofílica (AJUEBOR *et al.*, 1998).

Sabe-se que o NO durante artrite é produzido principalmente pela NOSi e que ele é um dos responsáveis pela migração celular na artrite na ATM induzida por Zy. Nossos resultados mostraram expressão de NOSi em condrócitos e sinoviócitos, e evidenciaram também que nos animais tratados com L-NAME houve redução da imunomarcagem para a enzima NOSi, sendo esta redução mais evidente nos animais

nos quais se administrou 1400 W, visto este ser inibidor seletivo para NOSi enquanto L-NAME atua como inibidor não-seletivo para as enzimas constitutiva e indutiva (MONCADA et al, 1991; GARVEY *et al.*, 1997). Na artrite em joelho induzida por antígenos também foi encontrada imunomarcação para NOSi na sinóvia inflamada, fato que também foi reduzido nos animais tratados com inibidores da NOS como o L-NIL (CONNOR *et al.*, 1995). Sabe-se que esses inibidores atuam inibindo a atividade da enzima NOS indutiva e não sua síntese, aqui identificada pela expressão celular através da imunomarcação para NOSi. O fato de inibidores da atividade da enzima NOS causarem, indiretamente, redução da expressão da enzima deve-se, provavelmente, à sua ação antiinflamatória na artrite da ATM induzida por Zy. Ao reduzirem, pois, o quadro inflamatório articular proporcionando redução da síntese de mediadores, deve ter havido redução da produção das enzimas indutivas.

Os mecanismos pelos quais NO oriundo da NOSi aumenta migração neutrofílica e causa dano tecidual ainda não estão claros. Uma possível explicação para esses achados advém do fato de que, durante inflamação, peroxinitritos são formados pela reação do NO advindo da NOSi com espécies reativas de oxigênio (ROS) (CROW & BECKMAN 1995; SZABÓ, 1996; SZABÓ *et al.*, 1997). O peroxinitrito pode iniciar peroxidação lipídica (RUBBO *et al.*, 1994), oxidação de proteínas (RADI *et al.*, 1991) e nitratação de resíduos de tirosina de várias proteínas (ISCHIROPOULOS *et al.*, 1992; BECKMAN, 1996; KONG *et al.*, 1996; BECKMAN & KOPPENOL, 1996; SZABO, 1996) resultando em dano tecidual que pode levar a amplificação da resposta inflamatória, causando aumento da migração de células inflamatórias. Salienta-se que já foi relatada na literatura a importante participação do peroxinitrito na progressão das DTMs (YAMAZA *et al.*, 2004).

Além disso, foi demonstrado que NO derivado da NOSi pode causar aumento da produção de vários mediadores pró-inflamatórios, como TNF- α e IL-6 (BRENNER *et al.*, 1997; HIERHOLZER *et al.*, 1998; AJUEBOR et al, 1998), e que a inibição da NOS pode aumentar a produção de IL-10, uma citocina anti-inflamatória (MUHL & DINARELLO, 1997). Portanto, a redução da migração neutrofílica e da imunomarcação para NOSi pela administração de inibidores da síntese de NO na artrite na ATM induzida por Zy deve-se, provavelmente, à supressão dos efeitos pró-inflamatórios de citocinas e da ação de peroxinitritos, ambos mediados pelos altos níveis de NO via ativação da NOSi, causando redução do processo inflamatório.

Nardini *et al.* (2004) realizaram lavagem da articulação temporomandibular com ácido hialurônico em pacientes com osteoartrite e observaram redução da concentração de NO no líquido sinovial, concomitante à redução dos sintomas e melhora funcional da articulação após o tratamento. Com isso, mostraram que pequenas concentrações de NO na ATM pode ser importante para a função articular, corroborado com nossos resultados, e sugerindo uma alternativa terapêutica.

Pode-se aventar, portanto, a possibilidade terapêutica em pacientes com DTM através do desenvolvimento de posteriores pesquisas com substâncias moduladoras da síntese ou da ação do NO. Por fim, os achados apresentados neste estudo reiteram a participação do NO na artrite da ATM induzida por Zy.

VI. CONCLUSÕES

VI. CONCLUSÕES

1. O modelo de artrite na articulação temporomandibular induzida por Zy em ratos padronizado neste trabalho sugere que a concentração de Zy para indução da doença seja de 2 mg, e que o momento para se estudar a fase aguda dessa inflamação seja na 6^a hora;
2. O modelo permitiu estudar as alterações histopatológicas nas fases aguda e crônica da artrite, sendo, portanto, confiável para a investigação da fisiopatologia das alterações inflamatórias e degenerativas na ATM, podendo ser reproduzido em estudos posteriores;
3. O presente trabalho sugere a participação do NO na patogênese da artrite na articulação temporomandibular induzida por Zy, participando dos processos de permeabilidade capilar e migração leucocitária.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUBAKER, a.o.; RASLAN, W. F.; SOTERENOS, G. C. Estrogen and progesterone receptors in temporomandibular joint discs of symptomatic and asymptomatic persons: a preliminary study. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 51, n. 10, p. 1096-1100, 1993.

AJUEBOR, M. N.; VIGÁG, L.; FLOWER, R. J.; PERRETTI, M.; SZABO, C. role of inducible nitric oxide synthase in the regulation of neutrophil migration in zymozan-induced inflammation. **Immunol.**, v. 95, p. 625-630, 1998.

AL-MOBIREEK, A.; DARWAZEH, A. M. G.; HASSANIN, M. B. Experimental induction of reumatoid arthritis in temporomandibular joint of the guinea pig: a clinical and radiographic study. **Dentomaxillofac. Radiol.**, v. 29, p. 286-290, 2000.

ALSTERGREN, P.; KOOP, S.. Pain and synovial fluid concentration of serotonin in arthritic temporomandibular joints. **Pain**, v. 72, n. 1/2, p. 137-143, 1997.

ALSTERGREN, P.; ERNBERG, M.; KVARNSTRÖM, M.; KOOP, S. Interleukin 1 β in synovial fluid from the arthritic temporomandibular joint and its relation to pain, mobility, and anterior open bite. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 6, n. 9, p. 1059-1065, 1998.

ALSTERGREN, P.; KOOP, S.; THEODORSSON, E. Synovial fluid from the temporomandibular joint: sample quality criteria and levels of interleukin-1 β and serotonin. **Acta Odontol. Scand.**, v. 57, n. 1, p. 16-22, 1999.

ALSTERGREN P. Cytokines in temporomandibular joint arthritis. **Oral Dis.**, v. 6, p. 331-334, 2000.

ALSTERGREN, P.; BENAVENTE, C.; KOOP, S. Interleukin 1 β , Interleukin 1 receptor antagonist, and Interleukin 1 soluble receptor II in temporomandibular joint synovial fluid from patients with chronic polyarthritides. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 61, n. 10, p. 1171-1178, 2003.

AMIN, A. R.; ABRAMSON, S. B. The role of nitric oxide in articular cartilage breakdown in osteoarthritis. **Curr. Opin. Rheumatol.**, v. 10, p. 263-268, 1998.

ANBAR, M.; GRATT, B. M. Role of Nitric Oxide in the physiopathology of pain. **J. Pain Symptom. Management**, v. 14, n. 4, p. 225-254, 1997.

ANBAR, M; GRATT, B. M. The possible role of nitric oxide in the physiopathology of pain associated with temporomandibular joint disorders. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 56, n. 7, p. 872-882, 1998.

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

BAGGIOLINI, M.; DEWALD, B.; MOSER, B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines. **Adv.Immunol.**, v. 55, p. 97-179, 1994.

BECKMAN, J. S. Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 9, n. 5, p. 836-344, 1996.

BECKMAN, J. S.; BECKMAN, T. W.; CHEN, J.; MARSHALL, P. A.; FREEMAN, B. A. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 87, n. 4, p. 1620-1624, 1990.

BECKMAN, J. S.; KOPPENOL, W. H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. **Am. J. Physiol.**, v. 271, p. C1424-C1437, 1996.

BELENKY, S. N.; ROBBINS, R. A.; RUBINSKTEIN, I. Nitric oxide synthase inhibitors attenuate human monocyte chemotaxis in vitro. **J. Leukoc. Biol.**, v. 53, n. 5, p. 498-503, 1993a.

BELENKY, S. N.; ROBBINS, R. A.; RENNARD, S. I.; GOSSMAN, G.L.; NELSON, N. J.; RUBINSKTEIN, I. Inhibitors of nitric oxide synthase attenuate human neutrophil chemotaxis in vitro. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 122, n. 4, p. 388-394, 1993.

BEZERRA, M. M. **Efeito protetor do bloqueio de peroxinitrito sobre a lesão da cartilagem articular na artrite induzida por Zymozan**. 2002. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2002.

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

BISGAARD, H.; KRISTENSEN, J. K. Leukotriene B4 produces hyperalgesia in humans. **Prostaglandins**, v. 30, n. 5, p. 791-797, 1985.

BOUGHTON-SMITH, N. K.; GHELANI, A. Role of induced nitric oxide synthase and increased NO levels in zymozan peritonitis in the rat. **Inflamm. Res. Supplement**, n. 2, p. S149-S150, 1995.

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

BREDT, D., S.; HAWANG, P. M.; GLATT, C. E.; LOWENSTEIN, C.; REED, R. R.; SNYDER, S. H. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. **Nature**, v. 351, n. 6329, p. 714-718, 1991.

BRENNER, T.; BROCKE., S.; SZAFER., F.; SOBEL., A.; PARKINSON. J. F.; PEREZ., D. H.; STEINMAN., L. Inhibition of nitric oxide synthase for treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis. **J. Immunol.**, v. 158, n. 6, p. 2940-2946, 1997.

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

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

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

CANNON, G. W., OPENSHAW, S. J.; HIBBS, J. B.; HOIDAL, J. R.; HUECKSTEADT, T. P; GRIFFITHS, M. M. Nitric oxide production during adjuvant-induced and collagen-induced arthritis. **Arthritis Rheum.**, v. 39, n. 10, p. 1677-1684, 1996.

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

CARRAWAY, R. E.; COCHRANE, D. E.; GRANIER, C.; KITABGI, P.; LEEMAN, E.; SINGER, E. A. Parallel secretion of endogenous 5-hydroxytryptamine and histamine from mast cells stimulated by vasoactive peptides and compound 48/80. **Br. J. Pharmacol.**, v. 81. n. 2, p. 227-229, 1984.

CHANDRASEKHARAN, N. V.; DAI, H. U.; ROSS, K. L. T.; EVANSON, N. K.; TOMSIK, J.; ELTON, T. S.; SIMMONS, D. L. COX-3, a Cyclooxygenase variant inhibited acetaminofen and others analgesic-antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 99, n. 21, p. 13926-13931, 2002.

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

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

CHENITZ, J. E. Rheumatoid arthritis and its implications in temporomandibular disorders. **Cranio**, v. 10, n. 1, p. 59-69, Jan. 1992.

CHRISTOPHERSON, K. S.; BREDET, D. S. Nitric oxide in excitable tissues: physiological roles and disease. **J. Clin. Invest.**, v. 100, n. 10, p. 2424-2429, 1997.

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

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

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

COLASANTI, M.; GRADONI, L.; MATTU, M.; PERSICHINI, T.; SALVATI, L.; VENTURINI, G.; ASCENZI, P. Molecular bases for the anti-parasitic effect of NO. **Int. J. Mol. Med.**, v. 9, n. 2, p. 131-134, 2002.

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

CONNOR, J. R.; MANNING, P. T.; SETTLE, S. L.; MOORE, W. M.; JEROME, G. M.; WEBBER, R.; TJOENG, F. S.; CURRIE, M. G. Suppression of adjuvant-induced arthritis by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 273, n. 1/2, p. 15-24, 1995.

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

CROMARTIE, W. J.; CRADDOCK, J. G.; SCHWAB, J. H.; ANDERLE, S. K.; YANG, C. H. Arthritis in rats after systemic injection of streptococcal cells or cells walls. **J. Exp. Med.**, v. 146, p. 1585-1602, 1977.

CROW., J. P.; BECKMAN., J. S. The importance of superoxide in nitric oxide-dependent toxicity: evidence for peroxynitrite-mediated injury. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 387, p. 147-161, 1996.

CUZZOCREA, S.; MAZZON, E.; CALABRO, G.; DUGO, L.; DE SARRO, A.; VAN DE LOO, F. A.; CAPUTI, A. P. Inducible nitric oxide synthase-knockout mice exhibit resistance to pleurisy and lung injury caused by carrageenan. **Am. J. Respir. Crit. Care. Med.**, v. 162, n. 5, p. 1859-1866, 2000.

DAL SECCO, D.; PARON, J. A.; OLIVEIRA, S. H. P.; FERREIRA, S. H.; SILVA, J. S.; CUNHA, F. Q. Neutrophil migration in inflammation: Nitric oxide inhibits rolling, adhesion and induces apoptosis. **Nitric Oxide**, v. 9, p. 153-164, 2003.

DAVIES, P.; BAILEY, P. J.; GOLDENBERG, M. M. The role of arachidonic acid oxygenation products in pain and inflammation. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 2, p. 335, 1984.

DE MELLO, S. B.; NOVAES, G. S.; LAURINDO, I. M.; MUSCARA, M. N.; MACIEL, F. M.; COSSERMELLI, W. Nitric oxide synthase inhibitor influences prostaglandin and interleukin-1 production in experimental arthritic joints. **Inflamm. Res.**, v. 46, n. 2, p. 72-77, 1997.

DELEURAN, B. W.; CHU, C. Q.; FIELD, M.; BRENNAN, F. M.; MITCHELL, T.; FELDMANN, M.; MAINI, R. N. Localization of tumor necrosis factor receptors in the synovial tissue and cartilage-pannus junction in patients with rheumatoid arthritis.

Implications for local actions of tumor necrosis factor alpha. **Arthritis Rheum.**, v. 35, n. 10, p. 1170-1178, 1992.

DE BRUM-FERNANDES, A. J.; DE FALCO, A. J.; ROCHA, F. A. C.; JANCAR, S. Paradoxical effect of dexamethasone administration to rabbits with antigen-induced arthritis. **Inflammopharmacol.**, v. 1, p. 289-294, 1992.

DE WIJER, A.; DE LEEUW, J. R.; STEENKS, M. H.; BOSMAN, F. Temporomandibular and cervical spine disorders. Self-reported signs and symptoms. **Spine**, v. 21, n. 14, p. 1638-1646, 1996.

DIJKGRAAF, L. C.; DE BONT, L. G.; BOERING, G.; LIEM, R. S. Normal cartilage structure, biochemistry, and metabolism: a review of the literature. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 53, p. 924-929, 1995.

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

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

DI ROSA, M.; RADOMSKI, M.; CARNUCCIO, R.; MONCADA, S. Glucocorticoids inhibit the induction of nitric oxide synthase in macrophages. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 172, n. 3, p. 1246-1252, 1990.

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

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

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

FANG, F. C. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. **J. Clin. Invest.**, v. 99, n. 12, p. 2818-2825, 1997.

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

FARRELL, A. J.; BLAKE, D. R.; PALMER, R. M.; MONCADA, S. Increased concentrations of nitrite in synovial fluid and serum samples suggest increased nitric oxide synthesis in rheumatic diseases. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 51, n. 11, p. 1219-1222, 1992.

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

FRANCO-PENTEADO, C. F.; DE SOUZA, I.; TEIXEIRA, S. A.; RIBEIRO DA SILVA, G.; DE NUCCI, G.; ANTUNES, E. Involvement of nitric oxide on the peritoneal neutrophil influx induced by staphylococcal enterotoxin B in mouse. **Toxicon**, v. 39, n. 9, p. 1383-1386, 2001.

FREDRIKSSON, L.; ALSTERGREN, P.; KOPP, S. Pressure pain thresholds in the craniofacial region of female patients with rheumatoid arthritis. **J. Orofac. Pain**, v. 17, n. 4, p. 326-332, 2003.

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

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

FU, K.; MA, X.; ZHANG, Z.; PANG, X.; CHEN, W. Interleukin-6 in synovial fluid and HLA-DR expression in synovium from patients with temporomandibular disorders. **J. Orofac. Pain.**, v. 9, n. 2, p. 131-137, 1995b.

FUJITA, S.; HOSHINO, K. Histochemical and immunohistochemical studies on the articular disk of the temporomandibular joint in rats. **Acta Anat.**, v. 134, n. 1, p. 26-30, 1989.

FURCHGOTT, R. F. Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle. **Circ. Res.**, v. 53, n. 5, p. 557-573, 1983.

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

GARVEY, E. P.; OPLINGER, J. A.; FURFINE, E. S.; KIFFI, R. J.; LASZLOI, F.; WHITTLEI, B. J. R.; KNOWLES, R. G. 1400W Is a Slow, Tight Binding, and Highly Selective Inhibitor of Inducible Nitric-oxide Synthase in Vitro and in Vivo. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 8, p. 4959–4963, 1997.

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

GEGOUT, P.; GILLET, P.; TERLAIN, B.; NETTER, P. Zymozan-induced arthritis in rats. II. Effects of anti-inflammatory drugs. **Life. Sci.**, v. 56, n. 20, p. 389-394, 1995.

GOULART, A. C.; CORREIA, F. A.; SOUSA, S. C.; LUZ, J. G. Study of the inflammatory process induced by injection of carrageenan or formalin in the rat temporomandibular joint. **Pesqui. Odontol. Bras.**, v. 19, n. 1, p. 99-105, 2005.

GRABOWSKI, P. S.; MACPHERSON, H.; RALSTON, S. H. Nitric oxide production in cells derived from the human joint. **Br. J. Rheumatol.**, v. 35, n. 3, p. 207-212, 1996.

GRABOWSKI, P. S.; WRIGHT, P. K.; VAN 'T HOF, R. J.; HELFRICH, M. H.; OHSHIMA, H.; RALSTON, S. H. Immunolocalization of inducible nitric oxide synthase in synovium and cartilage in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. **Br. J. Rheumatol.**, v. 36, n. 6, p. 651-655, 1997.

GRATT, B. M.; ANBAR, M. A pilot study of nitric oxide blood levels in patients with chronic orofacial pain. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 100, n. 4, p. 441-448, 2005.

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

GRIFFITHS, R. J.; PETTIPHER, E. R.; KOCH, K.; FARRELL, C. A.; BRESLOW, R.; CONKLYN, M. J.; SMITH, M. A.; HACKMAN, B. C.; WIMBERLY, D. J.; MILICI, A. J.; SCAMPOLI, D. N.; CHENG, J. B.; PILLAR, J. S.; PAZOLES, C. J.; DOHERTY, N. S.; MELVIN, L. S.; REITER, L. A.; BIGGARDS, S.; FALKNER, F. C.; MITCHELL, D. Y.; LISTON, T. E.; SHOWELL, H. J. Leukotriene B4 plays a critical role in the

progression of collagen-induced arthritis. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 92, n. 2, p. 517-21, 1995.

GRIFFITHS, R. J.; SMITH, M. A.; ROACH, M. L.; STOCK, J. L.; STAM, E. J.; MILICI, A. J.; SCAMPOLI, D. N.; ESKRA, J. D.; BYRUM, R. S.; KOLLER, B. H.; MCNEISH, J. D. Collagen-induced arthritis is reduced in 5-lipoxygenase-activating protein-deficient mice. **J. Exp. Med.**, v. 185, n. 6, p. 1123-1129, 1997.

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

HALL, P. D.; BENKO, H.; HOGAN, K. R.; STUART, R. K. The influence of serum tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 concentrations on nonhematologic toxicity and hematologic recovery in patients with acute myelogenous leukemia. **Exp. Hematol.**, v. 23, n. 12, p. 1256-1260, 1995.

HARKINS, S. J.; MARTENEY, J. L. Extrinsic trauma: a significant precipitating factor in temporomandibular dysfunction. **J. Prosthet. Dent.**, v. 54, n. 2, p. 271-272, 1985.

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

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

HENDERSON, W. R. The role of leukotrienes in inflammation. **Ann. Intern. Med.**, v. 121, n. 9, p. 684-697, 1994.

HERMAN, A. G.; MONCADA, S. Therapeutic potential of nitric oxide donors in the prevention and treatment of atherosclerosis. **Eur. Heart J.**, v. 26, n. 19, p. 1945-1955, 2005.

HICKEY, M. J.; KUBES, P. Role of nitric oxide in regulation of leucocyte-endothelial cell interactions. **Exp. Physiol.**, v. 82, n. 2, p. 339-348, 1997.

HICKEY, M. J.; SHARKEY, K. A.; SIHOTA, E. G.; REINHARDT, P. H.; MACMICKING, J. D.; NATHAN, C.; KUBES, P. Inducible nitric oxide synthase-

deficient mice have enhanced leukocyte-endothelium interactions in endotoxemia. **FASEB J.**, v. 11, n. 12, p. 955-964, 1997.

HIERHOLZER, C.; HARBRECHT, B.; MENEZES, J. M.; KANE, J.; MACMICKING, J.; NATHAN, C. F.; PEITZMAN, A. B.; BILLIAR, T. R.; TWEARDY, D. J. Essential role of induced nitric oxide in the initiation of the inflammatory response after hemorrhagic shock. **J. Exp. Med.**, v. 187, n. 6, p. 917-928, 1998.

HILLIQUIN, P.; BORDERIE, D.; HERNVANN, A.; MENKES, C. J.; EKINDJIAN, O. G. Nitric oxide as S-nitrosoproteins in rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.**, v. 40, n. 8, p. 1512-1517, 1997.

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

HOLSCHER, C. Nitric oxide, the enigmatic neuronal messenger: its role in synaptic plasticity. **Trends Neurosci.**, v. 20, n. 7, p. 298-303, 1997.

HOLMUND, A.; EKBLUM, A.; HANSSON, P.; LIND, J.; LUNDEBERG, T.; THEODORSSON, E. Concentrations of neuropeptides substance P, neurokinin A, calcitonin gene-related peptide, neuropeptide Y and vasoactive intestinal polypeptide in synovial fluid of the human temporomandibular joint. A correlation with symptoms, signs and arthroscopic findings. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 20, n. 4, p. 228-231, 1991.

HOMMA, H.; TAKAHASHI, T.; SEKI, H.; OHTANI, M.; KONDOH, T.; FUKUDA, M. Immunohistochemical localization of inducible nitric oxide synthase in synovial tissue of human temporomandibular joints with internal derangement. **Arch. Oral Biol.**, v. 46, n. 1, p. 93-99, 2001.

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

IGNARRO, L. J.; BUGA, G. M.; BYRNS, R. E.; WOOD, K. S.; CHAUDHURI, G. Endothelium-derived relaxing factor and nitric oxide possess identical pharmacologic properties as relaxants of bovine arterial and venous smooth muscle. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 246, n. 1, p. 218-226, 1988.

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

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

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

ISCHIROPOULOS., H.; ZHU., L.; CHEN., J.; TSAI., M.; MARTIN., J. C.; SMITH., C. D.; BECKMAN., J. S. Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 298, n. 2, p. 431-437, 1992.

ISRAEL, H. A.; DIAMOND, B.; SAED-NEJAD, F.; RATCLIFFE, A. Osteoarthritis and synovitis as major pathoses of the temporomandibular joint: comparison of clinical diagnosis with arthroscopic morphology. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 56. n. 9, p. 1023-1027, 1998.

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

JEANJEAN, A. P.; MOUSSAOUI, S. M.; MALOTEAUX, J. M.; LADURON, P. M. Interleukin-1 beta induces long-term increase of axonally transported opiate receptors and substance P. *Neuroscience*, v. 68, n. 1, p. 151-157, 1995.

JOHNSON, A. R.; HUGLI, T. E.; MULLER-EBERHARD, H. J. Release of histamine from rat mast cells by the complement peptides C3a and C5a. **Immunology**, v. 28, n. 6, p. 1067, 1975.

KAMISAKA, M.; YATANI, H.; KUBOKI, T.; MATSUKA, Y.; MINAKUCHI, H. Four-year longitudinal course of TMD symptoms in an adult population and the estimation of risk factors in relation to symptoms. **J. Orofac. Pain.**, v. 14, n. 3, p. 224-232, 2000.

KANEKO, S.; SATOH, T.; CHIBA, J.; JU, C.; INOUE, K.; KAGAWA., J. Interleukin-6 and interleukin-8 levels in serum and synovial fluid of patients with osteoarthritis. **Cytokines Cell Mol. Ther.**, v. 6, n. 2, p. 71-79, 2000.

KANEYAMA, K.; SEGAMI, N.; NISHIMURA, M.; SUZUKI, T.; SATO, J. Importance of proinflammatory cytokines in synovial fluid from 121 joints with temporomandibular disorders. **Br. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 40, n. 5, p. 418-423, 2002.

KANEYAMA, K.; SEGAMI, N.; SATO, J.; NISHIMURA, M.; YOSHIMURA, H. Interleukin-6 family of cytokines as biochemical markers of osseous changes in the temporomandibular joint disorders. **Br. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 42, n. 3, p. 246-250, 2004.

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

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

KAPILA, S.; XIE, Y. Targeted induction of collagenase and stromelysin by relaxin in unprimed and beta-estradiol-primed diarthrodial joint fibrocartilaginous cells but not in synoviocytes. **Lab. Invest.**, v. 78, n. 8, p. 925-938, 1998.

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

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

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

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

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

KIRCOS, L. T.; ORTENDAHL, D. A.; MARK, A. S.; ARAKAWA, M. Magnetic resonance imaging of the TMJ disc in asymptomatic volunteers. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 45, n. 10, p. 852-824, 1987.

KIRVESKARI, P.; JAMSA, T.; ALANEN, P. Occlusal adjustment and the incidence of demand for temporomandibular disorder treatment. **J. Prosthetic. Dent.**, v. 79, n. 4, p. 433-438, 1998.

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

KONG, S. K.; YIM, M. B.; STADTMAN E. R.; CHOCK P. B. Peroxynitrite disables the tyrosine phosphorylation regulatory mechanism: Lymphocyte-specific tyrosine kinase fails to phosphorylate nitrated cdc2(6-20)NH₂ peptide. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 93, n. 8, p. 3377-3382, 1996.

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

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

KOPP, S.; ALSTERGREN, P. Blood serotonin and joint pain in seropositive versus seronegative rheumatoid arthritis. **Mediators. Inflamm.**, v. 11, n. 4, p. 211-217, 2002.

KRENGER, W.; FERRARA, J. L. Dysregulation of cytokines during graft-versus-host disease. **J. Hematother.**, v. 5, n. 1, p. 3-14, 1996.

KRONN, E. The incidence of TMJ dysfunction in patients who have suffered a cervical whiplash injury following a traffic accident. **J. Orofac. Pain**, v. 7, n. 2, p. 209-213, 1993.

KUBES, P.; SUZUKI, M.; GRANGER, D. N. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 88, n. 11, p. 4651-4655, 1991.

KUBES, P.; KANWAR, S.; NIU, X. F.; GABOURY, J. P. Nitric oxide synthesis inhibition induces leukocyte adhesion via superoxide and mast cells. **FASEB J.**, v. 7, n. 13, p. 1293-1299, 1993.

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

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

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

LAM, D. K.; LAWRENCE, H. P.; TENENBAUM, H. C. Aural symptoms in temporomandibular disorder patients attending a craniofacial pain unit. **J. Orofac. Pain**, v. 15, n. 2, p. 146-157, 2001.

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

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

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

LEITÃO, R. F. C.; ROCHA, F. A. C.; CHAVES, H. V.; LIMA, V.; CUNHA, F.Q.; RIBEIRO, R. A.; BRITO, G. A. C. Locally applied isosorbide decreases bone resorption in experimental periodontitis in rats. **J. Periodontol.**, v. 75, n. 9, p. 1227-1232, 2004.

LEITÃO, R. F. C.; RIBEIRO, R. A.; CHAVES, H. V.; ROCHA, F. A. C.; LIMA, V.; BRITO, G. A. C. Nitric oxide synthase inhibition prevents alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats **J. Periodontol.**, v. 76, n. 6, p. 956-963, 2005.

LEITE, A. C. R. **Estudo da participação do óxido nítrico na migração celular aguda na artrite e peritonite induzidas por zymozan em modelos experimentais.** 2005. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

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

LEONORE, C. D.; LAMBERT, G. M.; DE BONT, L. G.; GREERT, B. The structure, biochemistry, and metabolism of osteoarthritic cartilage: a review of the Literature. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 53, p. 1182-1192, 1995.

LOCKER, D.; GRUSHKA, M. The impact of dental and facial pain. **J. Dent. Res.**, v. 66, n. 9, p. 1414-1417, 1987.

LOWENSTEIN, C. J.; DINERMAN, J. L.; SNYDER, S. H. Nitric oxide: a physiologic messenger. **Ann. Intern. Med.**, v. 120, n. 3, p. 227-237, 1994.

MACINTYRE, I.; ZAIDI, M.; ALAM, A. S.; DATTA, H. K.; MOONGA, B. S.; LIDBURY, P. S.; HECKER, M.; VANE, J. R. Osteoclastic inhibition: an action of nitric oxide not mediated by cyclic GMP. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 88, n. 7, p. 2936-2940, 1991.

MADLAND, G.; FEINMANN, C.; NEWMAN, S. Factors associated with anxiety and depression in facial arthromyalgia. **Pain**, v. 84, n. 2/3, p. 225-232, 2000.

MANFREDINI, D.; CANTINI, E.; ROMAGNOLI, M.; BOSCO, M. Prevalence of bruxism in patients with different research diagnostic criteria for temporomandibular disorders (RDC/TMD) diagnoses. **Cranio**, v. 21, n. 4, p. 279-285, 2003.

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

MASUDA, K. F.; YAMAZA, T.; TSUKIYAMA, Y.; MURAMAKI, R.; NISHIJIMA, K.; KIDO, M. A.; KOYANO, K.; TANAKA, T. Distribution of inducible nitric oxide synthase, interleukin-1 β receptor in the temporomandibular joint of normal rats. **Acta Histochem. Cytochem.**, v. 35, n. 1, p. 11-21, 2002.

MCCARTNEY-FRANCIS, N.; ALLEN, J. B.; MIZEL, D. E.; ALBINA, J. E.; XIE, Q. W.; NATHAN, C. F.; WAHL, S. M. Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. **J. Exp. Med.**, v. 178, n. 2, p. 749-754, 1993.

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

MIHARA, M.; MORIYA, Y.; KISHIMOTO, T.; OHSUGI, Y. Interleukin-6 (IL-6) induces the proliferation of synovial fibroblastic cells in the presence of soluble IL-6 receptor. **Br. J. Rheumatol.**, v. 34, n. 4, p. 321-325, 1995.

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

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

MONCADA, S.; HIGGS, E. A. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. **Br. J. Pharmacol.**, v. 147, n. 1, p. 193-201, 2006.

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

MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. The L-arginine-nitric oxide pathway. **N. Engl. J. Med.**, v. 329, p. 2002-2012, 1993.

MUHL, H.; DINARELLO, C. A. Macrophage inflammatory protein-1 alpha production in lipopolysaccharide-stimulated human adherent blood mononuclear cells is inhibited by the nitric oxide synthase inhibitor N(G)-monomethyl-L-arginine. **J. Immunol.**, v. 159, n. 10, p. 5063-5069, 1997.

MURAKAMI, K. I.; SHIBATA, T.; KUBOTA, E.; MAEDA, H. Intra-articular levels of prostaglandin E₂, hyaluronic acid, and chondroitin-4 and -6 sulfates in the temporomandibular joint synovial fluid of patients with internal derangements. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 56, n. 2, p. 199-203, 1998.

NAGAI, H.; KUMAMOTO, H.; FUKUDA, M.; TAKABASHI, T. Inducible nitric oxide synthase and apoptosis-related factors in the synovial tissues of temporomandibular joints with internal derangement and osteoarthritis. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 61, n. 7, p. 801-807, 2003.

NARDINI, L. G.; OLIVIERO, F.; RAMONDA, R.; FERRONATO, G. Influenza delle infiltrazioni intra-articolari con acido ialuronico sugli indici clinici e sui livelli di ossido nítrico nell'artrosi temporomandibulare. **Reumatismo**, v. 56, n. 4, p. 272-277, 2004.

NICOLAKIS, P.; ERDOGMUS, B.; KOPF, A.; DJABER-ANSARI, A.; PIEHSLINGER, E.; FIALKA-MOSER, V. Exercise therapy for craniomandibular disorders. **Arch. Phys. Med. Rehabil.**, v. 81, n. 9, p. 1137-1142, 2000.

NISHIMURA, M.; SEGAMI, N.; KANEYAMA, K.; SUZUKI, T.; MIYAMARU, M. Relationships between pain-related mediators and both synovitis and joint pain in patients with internal derangements and osteoarthritis of the temporomandibular joint. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 94, n. 3, p. 328-332, 2002.

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

NITZAN, D. W.; SAMSON, B.; BETTER, H. Long-term outcome of arthrocentesis for sudden-onset, persistent, severe closed lock of the temporomandibular joint. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 55, n. 2, p. 151-157, 1997.

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

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

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

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

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

OKAMOTO., K.; IMBE., H.; TASHIRO., A.; KUMABE., S.; SENBA., E. Blockade of peripheral 5HT3 receptor attenuates the formalin-induced nocifensive behavior in persistent temporomandibular joint inflammation of rat. **Neurosci. Let.**, v. 367, n. 2, p. 259-63, 2004.

OKAMOTO, K.; IMBE, H.; TASHIRO, A.; KIMURA, A.; DONISHI, T.; TAMAI, Y.; SENBA, E. The role of peripheral 5HT2A and 5HT1A receptors on the orofacial formalin test in rats with persistent temporomandibular joint inflammation. **Neuroscience**, v. 130, n. 2, p. 465-474, 2005.

OKESON, J. P. **Tratamento das desordens temporomandibulares e oclusão**. 4. ed. São Paulo: Artes Médicas, 2000.

OLIVO, S. A.; BRAVO, J.; MAGEE, D. J.; THIE, N. M.; MAJOR, P. W.; FLORES-MIR, C. The association between head and cervical posture and temporomandibular disorders: a systematic review. **J. Orofac. Pain.**, v. 20, n. 1, p. 9-23, 2006.

PAIVA, H. J. **Oclusão: noções e conceitos básicos**. 1. ed. São Paulo: Livraria Santos Editora; 1997.

PENG, H. B.; SPIECKER, M.; LIAO, J. K. Inducible nitric oxide: an autoregulatory feedback inhibitor of vascular inflammation. **J. Immunol.**, v. 161, n. 4, p. 1970-1976, 1998.

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

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

QUINN, J. H.; BAZAN, N. G. Identification of prostaglandin E2 and leukotriene B4 in the synovial fluid of painful, dysfunctional temporomandibular joints. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 48, n. 9, p. 968-961, 1990.

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

RADI, R.; BECKMAN, J. S.; BUSH, K. M.; FREEMAN, B. A. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. **J. Biol. Chem.**, v. 266, n. 7, p. 4244-4250, 1991.

RAJFER, J.; ARONSON, W. J.; BUSH, P. A.; DOREY, F. J.; IGNARRO, L. J. Nitric oxide as a mediator of relaxation of the corpus cavernosum in response to nonadrenergic, noncholinergic neurotransmission. **N. Engl. J. Med.**, v. 326, n. 2, p. 90-94, 1992.

RAND, M. J. Nitroergic transmission: nitric oxide as a mediator of non-adrenergic, non-cholinergic neuro-effector transmission. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 19, n. 3, p. 147-169, 1992.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

RALSTON, S. H.; GRABOWSKI, P. S. Mechanisms of cytokine induced bone resorption: role of nitric oxide, cyclic guanosine monophosphate, and prostaglandins. **Bone**, v. 19, n. 1, p. 29-33, 1996.

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

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

RAUSTIA, A. M.; POHJOLA, R. T.; VIRTANEN, K. K. Acupuncture compared with stomatognathic treatment for TMJ dysfunction. Part I: A randomized study. **J. Prosthet. Dent.**, v. 54, n. 4, p. 581-585, 1985.

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

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

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

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

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

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

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

RUBBO, H.; RADI, L.; TRUGILLO, M.; TELLERI, R.; KALYANARAMAN, B.; BARNES, S.; KIRK, M.; FREEMAN, B. A. Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 42, p. 26066-26075, 1994.

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

SAHA, R.N.; PAHAN, K. Signals for the induction of nitric oxide synthase in astrocytes. **Neurochem. Int.**, 2006.

SANDERS, B. Arthroscopic surgery of the temporomandibular joint: treatment of internal derangement with persistent closed lock. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 62, n. 4, p. 361-372, 1986.

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

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

SATO, J.; SEGAMI, N.; KANEYAMA, K.; YOSHIMURA, H.; FUJIMURA, K.; YOSHITAKE, Y. Relationship of calcitonin gene-related peptide in synovial tissues and temporomandibular joint pain in humans. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 98, n. 5, p. 533-540, 2004.

SCHNURR, R. F.; BROOKE, R. I.; ROLLMAN, G. B. Psychosocial correlates of temporomandibular joint pain and dysfunction. **Pain**, v. 42, n. 2, p. 153-165, 1990.

SEHARA, Y.; HAYASHI, T.; DEGUCHI, K.; NAGOTANI, S.; ZHANG, H.; SHOJI, M.; ABE, K. Distribution of inducible nitric oxide synthase and cell proliferation in rat brain after transient middle cerebral artery occlusion. **Brain Res.**, v. 1093, n. 1, p. 190-197, June 2006.

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

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

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

SHIMIZU, T.; WOLFE, L. S. Arachidonic acid cascade and signal transduction. **J. Neurochem.**, v. 55, n. 1, p. 1-15, July 1990.

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

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

SONIS, S. T.; PETERSON, R. L.; EDWARDS, L. J.; LUCEY, C. A.; WANG, L.; MANSON, L.; LOGIN, G.; YMAMKAWA, M.; MOSES, G.; BOUCHARD, P.; HAYES, L. L.; BEDROSIAN, C.; DORNER, A. J. Defining mechanisms of action of interleukin-11 on the progression of radiation-induced oral mucositis in hamsters. **Oral Oncol.**, v. 35, n. 4, p. 373-381, 2000.

SOUTHAM, E.; GARTHWAITE, J. The nitric oxide-cyclic GMP signalling pathway in rat brain. **Neuropharmacology**, v. 32, n. 11, p. 1267-1277, 1993.

SOUZA-FILHO, M. V.; LIMA, M. V.; POMPEU, M. M.; BALLEJO, G.; CUNHA, F. Q.; RIBEIRO, R. A. Involvement of nitric oxide in the pathogenesis of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis. **Am. J. Pathol.**, v. 150, n. 1, p. 247-256, 1997.

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

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

STEGENGA, B. Osteoarthritis of the temporomandibular joint organ and its relationship to disc displacement. **J. Orofac. Pain.**, v. 15, n. 3, p. 193-205, 2001.

STICHTENOTH, D. O.; FAULER, J.; ZEIDLER, H.; FROLICH, J. C. Urinary nitrate excretion is increased in patients with rheumatoid arthritis and reduced by prednisolone. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 54, n. 10, p. 820-824, 1995.

SUENAGA, S.; ABEYAMA, K.; HAMASAKI, A.; MUIMURA, T.; NOIKURA, T. Temporomandibular disorders: relationship between joint pain and effusion and nitric oxide concentration in the joint fluid. **Dentomaxillofac. Radiol.**, v. 30, p. 214-218, 2001.

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

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

SZABO, C. The pathophysiological role of peroxynitrite in shock, inflammation, and ischemia-reperfusion injury. **Shock**, v. 6, n. 2, p. 79-88, 1996.

SZABO, C.; FERRER-SUETA, G.; ZINGARELLI, B.; SOUTHAN, G. J.; SALZMAN, A. L.; RADI, L. Mercaptoethylguanidine and guanidine inhibitors of nitric-oxide synthase react with peroxynitrite and protect against peroxynitrite-induced oxidative damage. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 14, p. 9030-9036, 1997.

TAIWO, Y. O.; LEVINE, J. D. Serotonin is a directly-acting hyperalgesic agent in the rat. **Neuroscience**, v. 48, n. 2, p. 485-490, 1992.

TAKAHASHI, T.; KONDOH, T.; KAMEI, K.; SEKI, H.; FUKUDA, M.; NAGAI, H.; TAKANO, H.; YAMAZAKI, Y. Elevated levels of nitric oxide in synovial fluid from patients with temporomandibular disorders. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 82, p. 505-509, 1996.

TAKAHASHI, T.; KONDOH, T.; OTHANI, M.; HOMMA, H.; FUKUDA, M. Association between arthroscopic diagnosis of temporomandibular joint osteoarthritis and synovial fluid nitric oxide levels. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 88, p. 129-136, 1999.

TAKAHASHI, T.; HOMMA, H.; NAGAI, H.; SEKI, H.; KONDOH, T.; YAMAZAKI, Y.; FUKUDA, M. Specific expression of inducible nitric oxide synthase in the synovium of the diseased temporomandibular joint. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 95, p. 174-181, 2003.

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

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

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

TOKUNAGA, A.; SAIKA, M.; SENBA, E. 5-HT_{2A} receptor subtype is involved in the thermal hyperalgesic mechanism of serotonin in the periphery. **Pain**, v. 76, n. 3, p. 349-355, 1998.

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

TOMINAGA, K.; ALSTERGREN, P.; KURITA, H.; KOPP, S. Serotonin in an antigen-induced arthritis of the rabbit temporomandibular joint. **Arch. Oral Biol.**, v. 44, n. 7, p. 595-601, 1999.

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

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

UEKI, Y.; MIYAKE, S.; TOMINAGA, Y.; EGUCHI, K. Increased nitric oxide levels in patients with rheumatoid arthritis. **J. Rheumatol.**, v. 23, n. 2, p. 230-236, 1996.

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

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

VOOG, U.; ALSTERGREN, P.; LEIBUR, E.; KALLIKORM, R.; KOPP, S. Influence of serotonin on the analgesic effect of granisetron on temporomandibular joint arthritis. **Mediators Inflamm.**, v. 13, n. 5-6, p. 373-376, 2004.

WÄNMAN, A. Longitudinal course of symptoms of craniomandibular disorders in men and women. A 10-year follow-up study of an epidemiologic sample. **Acta Odontol. Scand.**, v. 54, n. 6, p. 337-342, 1996.

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

WEINBERG, J. B.; MISUKONIS, M. A.; SHAMI, P. J.; MASON, S. N.; SAULS, D. L.; DITTMAN, W. A.; WOOD, E. R.; SMITH, G. H.; MCDONALD, B.; BACHUS, K. E. Human mononuclear phagocyte inducible nitric oxide synthase (iNOS): analysis of iNOS mRNA, iNOS protein, bioproterin and nitric oxide production by blood monocytes and peritoneal macrophages. **Blood**, v. 86, n. 3, p. 1184-1195, 1995.

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

WESTACOTT, C. I.; WHICHER, J. T.; BARNES, I. C.; THOMPSON, D.; SWAN, A. J.; DIEPPE, P. A. Synovial fluid concentration of five different cytokines in rheumatic diseases. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 49, n. 9, p. 676-681, 1990.

WEBSTER, R. O.; HONG, S. R.; JOHNSTON, R. B.; HENSON, P. M. Biological effects of the human complement fragments C5a and C5a des Arg on neutrophil function. **Immunopharmacology**, v. 2, n. 3, p. 201-219, 1980.

WHEELER, M. A.; SMITH, S. D.; GARCIA-CARDENA, G.; NATHAN, C. F.; WEISS, R. M.; SESSA, W. C. Bacterial infection induces nitric oxide synthase in human neutrophils. **J. Clin. Invest.**, v. 99, p. 110-116, 1997.

WITTENBERG, R. H.; WILLBURGER, R. E.; KLEEMEYER, K. S.; PESKAR, B. A. In vitro release of prostaglandins and leukotrienes from synovial tissues, cartilage, and bone in degenerative joint diseases. **Arthritis. Rheum.**, v. 36, p. 1444, 1993.

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

XIE, Q. W.; CHO, H. J.; CALAYCAY, J.; MUMFORD, R. A.; SWIDEREK, K. M.; LEE T. D.; DING, A.; TROSO, T.; NATHAN, C. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. **Science**, v. 256, n. 5054, p. 225-228, 1992.

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

YAMADA, K.; NOZAWA-INOUE, K.; KAWANO, Y.; KOHNO, S.; AMIZUKA, N.; IWANAGA, T.; MAEDA, T. Expression of estrogen receptor alpha (ER alpha) in the rat temporomandibular joint. **Anat. Rec. A. Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.**, v. 274, n. 2, p. 934-941, 2003.

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

YAMAZA, T.; MASUDA, K. F.; ATSUTA, I.; NISHIJIMA, K.; KIDO, M. A.; TANAKA, T. Oxidative stress-induced DNA damage in the synovial cells of the temporomandibular joint in the rat. **J. Dent. Res.**, v. 83, n. 8, p. 619-24, 2004.

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

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

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

ANEXO

ANEXO : Trabalhos completos publicados em periódicos indexados.

Anexo 1.

CHAVES, Hellíada Vasconcelos; LEITÃO, Aline Kércia Adeodato; FARRAPO, Analis Rodrigues; RIBEIRO, Ronaldo de Albuquerque; BRITO, Gerly Anne de Castro. Papel de mediadores inflamatórios na dor, na inflamação e em processos degenerativos da articulação temporomandibular. JBA. Jornal brasileiro de oclusão, ATM & dor orofacial, v. 5, n. 18, p. 76-84, 2005.

Anexo 2.

LEITÃO, Renata Ferreira de Carvalho; RIBEIRO, Ronaldo de Albuquerque; CHAVES, Hellíada Vasconcelos; ROCHA, Francisco Airton C; LIMA, Vilma de; BRITO, Gerly Anne de Castro. Nitric oxide synthase inhibition prevents alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. Journal of Periodontology, Chicago, Estados Unidos, v. 76, n. 6, p. 953-956, 2005.

Anexo 3.

MENEZES, Adriana Magalhães Andrade de; ROCHA, Francisco Airton C; CHAVES, Hellíada Vasconcelos; CARVALHO, C B M; RIBEIRO, Ronaldo de Albuquerque; BRITO, Gerly Anne de Castro. Effect of sodium alendronate on alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. Journal of Periodontology, Chicago, Estados Unidos, v. 76, n. 11, p. 1901-1909, 2005.

Anexo 4.

LEITÃO, Renata Ferreira de Carvalho; ROCHA, Francisco Airton C; CHAVES, Hellíada Vasconcelos; LIMA, Vilma de; CUNHA, Fernando Q; RIBEIRO, Ronaldo de Albuquerque; BRITO, Gerly Anne de Castro. Locally applied isossorbide decrease bone resorption in experimental periodontitis in rats. Journal of Periodontology, Chicago, Estados Unidos, v. 75, p. 1225-1230, 2004.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)