

**FLÁVIA BATISTA CHAVES DE LIRA**

**ESTUDO DOS EFEITOS DO COMPOSTO GYY-4137, UM DOADOR  
DE SULFETO DE HIDROGÊNIO ( $H_2S$ ), NA SINOVITE AGUDA  
INDUZIDA POR CARRAGENINA NA ARTICULAÇÃO  
TEMPOROMANDIBULAR DE RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Nicolás Muscará

Versão original

São Paulo  
2016

## RESUMO

Lira FBC. Estudo dos efeitos do composto GYY-4137, um doador de sulfeto de hidrogênio ( $H_2S$ ), na sinovite aguda induzida por carragenina na articulação temporomandibular de ratos. [dissertação (Mestrado em Farmacologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

O sulfeto de hidrogênio ( $H_2S$ ) é uma molécula sinalizadora produzida endogenamente que desempenha um importante papel em diversos processos fisiológicos e patológicos, incluindo na inflamação e nocicepção. Apesar do reconhecimento de sua importância biológica e de seus efeitos benéficos, os mecanismos de ação do  $H_2S$  nos processos inflamatórios articulares não estão definitivamente estabelecidos. Em vista disso, os objetivos deste estudo são avaliar os efeitos de um doador de  $H_2S$  de liberação lenta, GYY-4137, na sinovite induzida pela injeção intra-articular de carragenina (CGN) na ATM de ratos Wistar machos, e caracterizar farmacologicamente os mecanismos envolvidos. Os resultados deste estudo mostraram que a injeção de CGN induziu sinovite aguda na ATM dos animais, caracterizada por alodinia mecânica, recrutamento de neutrófilos na cavidade, aumento do infiltrado neutrofílico na membrana sinovial (avaliado como atividade de MPO) e aumento da produção de citocinas IL-1 $\beta$  e IL-6. A administração concomitante de GYY-4137 reduziu a alodinia mecânica e o influxo leucocitário. Com relação aos mecanismos envolvidos, observamos que o bloqueio dos canais de potássio dependentes de ATP ( $K_{ATP}$ ) pela glibenclamida antagonizou o efeito antinociceptivo do GYY-4137 sem interferir no recrutamento de leucócitos. Ainda, observamos que o GMPC participa das ações anti-inflamatória e antinociceptiva do  $H_2S$  de forma contrária, visto que a inibição da enzima guanilato ciclase solúvel pelo ODQ antagonizou a ação anti-inflamatória do GYY-4137 (mas não afetou a antinociceptiva), e a inibição da enzima fosfodiesterase-V pelo sildenafil foi capaz de reverter a ação antinociceptiva do GYY-4137 sem afetar sensivelmente a anti-inflamatória (avaliada pela atividade tecidual de MPO). Estes resultados evidenciam que doadores de  $H_2S$  como o GYY-4137 possuem potencial terapêutico para serem usados no tratamento de distúrbios temporomandibulares de etiologia inflamatória.

**Palavras-chave:** Inflamação. Articulação temporomandibular. Sulfeto de hidrogênio. Carragenina. Sinovite. Nocicepção. Rato.

## ABSTRACT

Lira FBC. Study of the effects of GYY-4137 compound, a donor of hydrogen sulfide ( $H_2S$ ), in carrageenan-induced acute synovitis in temporomandibular joint of rats. [dissertation (Master thesis in Pharmacology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

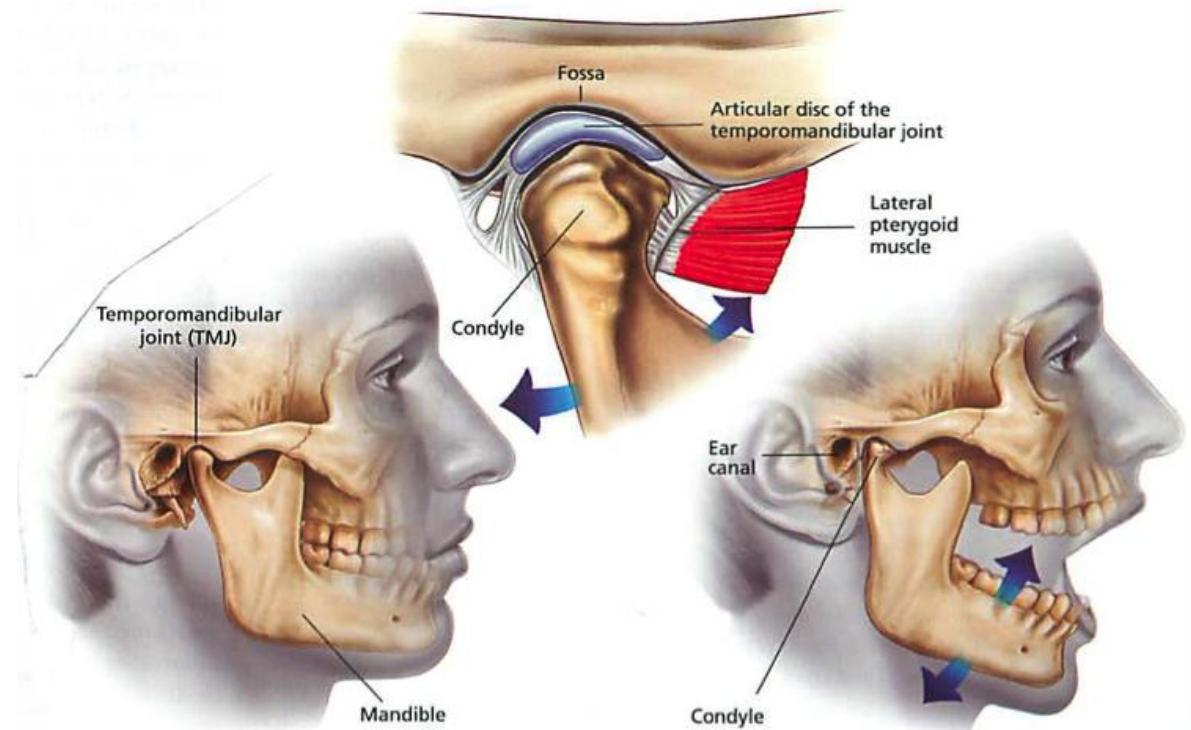
Hydrogen sulfide ( $H_2S$ ) is an endogenously produced signaling molecule that plays important roles in many physiological and pathological processes, including inflammation and nociception. Despite the recognition of its biological importance and beneficial effects, the mechanisms of action of  $H_2S$  in joint inflammation are not definitely established. In this way, the objectives of this study were to evaluate the effects of a slow-releasing  $H_2S$  donor, GYY-4137, in synovitis induced by intra-articular injection of carrageenan (CGN) into the TMJ of male Wistar rats, and to pharmacologically characterize the mechanisms involved. The results of this study showed that the injection of CGN induced acute synovitis in TMJ of the animals, characterized by mechanical allodynia, neutrophil recruitment into the cavity, increased neutrophil infiltrate into the synovial membrane (evaluated as MPO activity) and increased production of the cytokines IL-1 $\beta$  and IL-6. The concomitant administration of GYY-4137 reduced mechanical allodynia and leukocyte influx. Regarding the mechanisms involved, we observed that the blockade of ATP-sensitive potassium channels ( $K_{ATP}$ ) by glibenclamide antagonized the analgesic effect of GYY-4137 without interfering with leukocyte recruitment. In addition, we found that cGMP participates in the anti-inflammatory and antinociceptive actions of  $H_2S$  in an opposite way, as the inhibition of soluble guanylate cyclase by ODQ antagonized the anti-inflammatory actions of GYY-4137 (but did not affect the antinociceptive effects), and the inhibition of phosphodiesterase-V by sildenafil was able to reverse the antinociceptive action of GYY-4137 without substantially affecting the anti-inflammatory actions (as assessed by tissular MPO activity). These results evidence that  $H_2S$  donors like GYY-4137 have therapeutic potential for being used in the treatment of temporomandibular disorders of inflammatory etiology.

**Keywords:** Inflammation. Temporomandibular joint. Hydrogen sulfide. Carrageenan. Synovitis. Nociception. Rat.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Articulação temporomandibular

A articulação temporomandibular (ATM) é uma ligação móvel situada em cada um dos lados da cabeça que permite à mandíbula realizar movimentos em torno de um osso fixo. Esta articulação é constituída de um componente fixo (fossa mandibular do osso temporal), um componente móvel (processo condilar da mandíbula) e um disco articular fibrocartilaginoso localizado entre os dois (Figura 1; Bath-Balogh, Fehrenbach, 2008; Madeira, 2012). Considerada uma das articulações mais complexas do corpo e presente apenas nos mamíferos, esta articulação permite que a mandíbula se move como uma unidade, tanto em movimento de dobradiça como de deslizamento. Juntamente com as estruturas ósseas, ligamentos e musculatura associada, permite os movimentos de mastigação, deglutição, fonética e postura mandibular (Madeira, 2012; Stankovic et al., 2013).



**Figura 1: Articulação temporomandibular:** Localização da fossa mandibular do osso temporal, do condilo da mandíbula e do disco articular fibrocartilaginoso que compõem a ATM. FONTE: North Shore Oral and Maxillofacial Surgery, 2015.

A ATM é envolvida totalmente pela cápsula articular, que cerca todo o fluido sinovial e orienta os movimentos da mandíbula (Biasotto-Gonzalez, 2005; Nanci, 2008). Extensões da cápsula na cavidade articular formam o disco articular, que permite a distribuição da tensão e maior estabilidade da ATM. Esta estrutura divide a articulação em dois compartimentos: acima do disco a cápsula é bastante frouxa, enquanto que abaixo, é ligada firmemente no côndilo (Nanci, 2008; Stankovic et al., 2013).

Morfologicamente a camada externa da cápsula articular é resistente, composta por tecido conjuntivo fibroso e reforçada pelos ligamentos associados à ATM, enquanto a superfície interna é revestida por células epiteliais específicas que formam a membrana sinovial (Avery, 2005; Bath-Balogh, Fehrenbach, 2008). A membrana sinovial é composta por duas camadas: uma íntima celular localizada sobre uma subintima vascular. A subintima é um tecido conjuntivo frouxo contendo elementos vasculares dispersos com fibroblastos, macrófagos, mastócitos, células adiposas e algumas fibras elásticas. A íntima varia em estrutura, tendo uma a quatro camadas de células sinoviais incorporadas em uma matriz intercelular amorfa, livre de fibras (Alvez et al., 2014; Nanci, 2008). As principais células formando esta camada são de dois tipos: a célula tipo A semelhante a macrófagos e a célula tipo B semelhante a fibroblastos (Alvez et al., 2014; Iwanaga et al., 2000; Nozawa-Inoue et al., 2003).

As células do tipo A semelhantes a macrófagos são caracterizadas pela presença de numerosos vacúolos, vesículas e lisossomas e têm alta atividade migratória e fagocítica. Estudos realizados por Nozawa-Inoue et al. (2003) demonstraram que ocorre aumento de células do tipo A na inflamação da membrana sinovial e que essas células são capazes de produzir substâncias pró-inflamatórias como o óxido nítrico (NO) produzido pela enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS). As células do tipo B, por sua vez, são caracterizadas pela presença de um retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvido e grânulos secretórios, e são responsáveis por produzir e secretar componentes do fluido sinovial e da matriz extracelular, incluindo ácido hialurônico, colágeno e fibronectina, presentes no líquido sinovial, bem como mediadores envolvidos em processos inflamatórios como citocinas e enzimas metaloproteinases de matriz (Iwanaga et al., 2000; Sieghart et al., 2015).

O líquido sinovial consiste em um dialisado de plasma sanguíneo com grandes quantidades de ácido hialurônico e glicosaminoglicanos com viscosidade suficiente para manter lubrificadas as superfícies articulares. Além disso, é responsável por atender às necessidades metabólicas dos tecidos e pela drenagem dos metabólitos liberados pelas células, enquanto os elementos celulares do sistema imunológico se encarregam dos processos de fagocitose. A viscosidade do líquido sinovial pode ser alterada em decorrência de inflamação ou infecção. Com a diminuição da viscosidade, a cartilagem articular pode sofrer erosão ou tornar-se vulnerável a enzimas degradativas, dando início a processos degenerativos (Avery, 2005; Biasotto-Gonzalez, 2005; Nanci, 2008).

## **1.2 Disfunções temporomandibulares**

O desequilíbrio das estruturas que formam a ATM pode resultar em quadros de disfunção temporomandibular (DTM), um termo genérico que corresponde a um conjunto de condições clínicas que envolvem a articulação temporomandibular, a musculatura da mastigação ou estruturas relacionadas (Okeson, 2008).

A etiologia das DTM é descrita como multifatorial, com influência de fatores biológicos e psicológicos, tais como lesões traumáticas ou degenerativas da ATM, alterações esqueléticas, alterações na oclusão, fatores emocionais, bruxismo, ausências dentárias, mastigação unilateral, má postura corporal e hábitos parafuncionais (Furquim et al., 2015; Okeson, 2008).

Tais desordens afetam cerca de 5% da população e podem ocorrer em todas as faixas etárias, mas principalmente entre 20 e 40 anos. A incidência é maior em mulheres, em uma proporção estimada de 5:1 em relação aos homens e apenas 10% da população acometida busca ajuda terapêutica (Bagis et al., 2012; Biasotto-Gonzalez, 2005; Manfredini et al., 2011).

A DTM pode desencadear uma grande variedade de sinais e sintomas, que incluem dor nos músculos da mastigação e da ATM, alteração na dinâmica mandibular, limitação ou desvio da abertura madibular, ruídos articulares, cefaléias, zumbidos e compressões. A somatória ou a exacerbção desses sintomas acaba por limitar ou mesmo incapacitar o indivíduo em suas atividades diárias, causando redução significativa em sua qualidade de vida (Bagis et al., 2012; Dahlström, Carlsson, 2010; Kostrzewska-Janicka et al., 2013).

O diagnóstico é feito por meio de exame físico, com avaliação geral da cabeça e pescoço, palpação dos músculos mastigatórios, análise oclusal, exame da abertura e fechamento da mandíbula e palpação da ATM. Além disso, análises radiográficas podem ser utilizadas como ferramentas de diagnóstico suplementares (Oliveira, 2008; Siqueira, 2001).

Em geral as DTM podem ser classificadas como disfunções articulares e não articulares. São denominadas não articulares quando afetam os músculos da mastigação e normalmente são decorrentes de bruxismo, compressão e hábitos parafuncionais, resultando em dores musculares, cefaléias, espasmos e limitação funcional. As disfunções articulares por sua vez podem ser divididas em inflamatórias e não inflamatórias. As desordens inflamatórias articulares incluem artrite reumatóide, artrite psoriática, gota, artrite infecciosa e sinovite, enquanto as disfunções não inflamatórias incluem osteoartrite, lesões articulares decorrentes de trauma ou cirurgia prévia e outros distúrbios da cartilagem e ossos. Estas podem levar a dores, desvios mandibulares, ruídos articulares e limitação da abertura da mandíbula (Oliveira, 2008; Siqueira, 2001).

A dor miofascial pode ser tratada com combinações de medicamentos anti-inflamatórios não esteróides (AINES), placas oclusais estabilizadoras, fisioterapia, relaxantes musculares e injeções locais com combinações de anestésicos e esteróides (Cairns, 2010; Siqueira, 2001).

O tratamento para as DTMs articulares é dividido em 3 categorias: não invasivo, minimamente invasivo e invasivo. O tipo de tratamento empregado varia de acordo com o diagnóstico e a gravidade da disfunção. As placas estabilizadoras e os tratamentos farmacológicos são os tratamentos não invasivos mais empregados. A farmacoterapia visa tratar a doença e os sintomas associados, como dor e inchaço e muitas vezes associações medicamentosas são necessárias para se cumprir este objetivo. Em pacientes que não respondem às modalidades mais conservadoras, tratamentos minimamente invasivos podem ser empregados, como a artrocentese (aspiração do líquido sinovial e lavagem da cavidade) e a artroscopia (Liu, Steinkeler, 2013).

A artroplastia e a substituição total da articulação são dois tratamentos invasivos. A primeira consiste na remodelação da superfície articular para remover erosões e irregularidades e no reposicionamento do disco articular ou sua total remoção. A substituição total da articulação visa restaurar a forma e a função da

ATM e é indicada apenas para articulações severamente afetadas quando há falha de todos os outros tipos de tratamento (Tanaka et al., 2008).

### **1.3 Processo inflamatório na sinovite**

Uma das disfunções que podem afetar a ATM é a inflamação na membrana sinovial, denominada sinovite, que normalmente está associada a outras desordens temporomandibulares como a artrite. A sinovite é caracterizada por infiltração de células inflamatórias, aumento da camada de revestimento sinovial e frequentemente progride para alterações intracapsulares, remodelamento e degeneração da cartilagem articular (Israel et al., 2006; Ogura, Kondoh, 2014). Neste sentido, as células sinoviais semelhantes a fibroblastos (FLS) desempenham um papel fundamental na progressão da inflamação na ATM devido a sua capacidade de produzir um grande número de mediadores inflamatórios (Kardel et al., 2003; Satoh et al., 2009; Sieghart et al., 2015).

Bouloux (2009), conclui em seu estudo que um dos fatores responsáveis por induzir a sinovite é o aumento nos níveis de interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ) e/ ou fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) na cavidade articular. Os níveis dessas citocinas são significativamente mais elevados nos fluidos sinoviais de pacientes com DTM, em comparação àqueles com ATM saudável (Feldmann et al., 2004; Gulen et al., 2009; Tominaga et al., 2004).

A IL-1 $\beta$  é produzida por vários tipos de células, como macrófagos, fibroblastos, osteoblastos e sinoviócitos. O TNF- $\alpha$  é produzido principalmente por macrófagos ativados no tecido sinovial inflamado, e em menor proporção, por linfócitos T, células natural killer, mastócitos e fibroblastos (Matsumoto et al., 2006; Ogura, Kondoh, 2014). Essas citocinas desempenham um importante papel em reações imunológicas e inflamatórias, bem como na resposta à dor (Kaneyama et al., 2007; Kerins et al., 2004; Schütz et al., 2007). Além disso, podem causar degradação da cartilagem e reabsorção óssea por meio do aumento na expressão de genes de metaloproteinases de matriz e diminuição das vias de síntese compensatórias nos condrócitos (Aida et al., 2006; Kostrzewska-Janicka et al., 2013; Lv et al., 2012; Tanimoto et al., 2011).

Quando os níveis de IL-1 $\beta$  e/ ou TNF- $\alpha$  aumentam nos fluidos sinoviais, as células FLS aumentam a produção de quimiocinas e moléculas de adesão. Estes

fatores estimulam a quimiotaxia de neutrófilos, macrófagos e linfócitos T, e o acúmulo dessas células nos tecidos sinoviais pode gerar danos estruturais significativos para as articulações (Patterson et al., 2002). A presença dessas células inflamatórias pode ser detectada no tecido e no fluido sinovial de pacientes com DTM (Ogura, Kondoh, 2014).

A destruição dos tecidos, em última análise, depende da produção de radicais livres e espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (p. ex. ânion superóxido, peróxido de hidrogênio - H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, radical hidroxilo e NO) pelos neutrófilos e macrófagos na articulação inflamada (Hitchon, El-Gabalawy, 2004). O líquido sinovial humano não possui grande quantidade de componentes antioxidantes, como glutatona, glutatona peroxidase, superóxido dismutase e catalase e, desse modo, os radicais livres gerados não são eliminados de maneira eficaz, resultando em estresse oxidativo, e lipoperoxidação (Hitchon, El-Gabalawy, 2004; Seven et al., 2008). A identificação dos produtos de peroxidação lipídica tanto no fluido sinovial como no soro de pacientes com DTM tem sido reconhecida como uma evidência indireta do efeito dos radicais livres como mediadores de danos teciduais articulares (Seven et al., 2008). Além disso, pacientes com DTM submetidos à artroscopia apresentaram concentração de NO significativamente mais elevada em comparação com controles saudáveis (Alpaslan et al., 2000; Homma et al., 2001).

A IL-1 $\beta$  também induz a expressão da enzima cicloxigenase-2 (COX-2), tanto nas células FLS como em células endoteliais, células mononucleares e na membrana sinovial de pacientes com diferentes DTMs (Hardy et al., 2002; Kojima et al., 2004; Seki et al., 2004; Tanimoto et al., 2011). As enzimas COX catalizam a conversão do ácido araquidônico a prostaglandinas (PG) e tromboxano A<sub>2</sub>, considerados cruciais para o metabolismo fisiológico de vários tecidos. A COX-2 é uma isoforma induzível, regulada por uma variedade de citocinas e mediadores pró-inflamatórios e desempenha importante papel no processo de inflamação (Smith et al., 1996). Satoh et al. (2009) demonstraram que a IL-1 $\beta$  aumenta a produção de PGE<sub>2</sub> via COX-2 em cultura de células FLS humanas. A PGE<sub>2</sub> também foi encontrada no fluido sinovial de pacientes com diferentes tipos de DTMs e está associada ao grau de sinovite e dor (Alstergren, Kopp, 2000; Arinci et al., 2005).

Fibras nervosas mielinizadas e não mielinizadas com terminações nervosas livres, algumas das quais contendo neuropeptídeos associados com a dor e a inflamação (peptídeo relacionado ao gene da calcitonina - CGRP; substância P - SP)

inervam a cápsula articular, a membrana sinovial e o disco articular (Cairns, 2006). PGE<sub>2</sub>, bem como leucotrieno B<sub>4</sub>, bradicinina, serotonina, histamina, glutamato e adenosina trifosfato (ATP), são chamados de compostos pró-nociceptivos, pois são capazes de ativar e sensibilizar nociceptores, e induzir comportamento de dor em modelos animais (Cairns et al., 2001; Oliveira et al., 2005; Takeuchi et al., 2004). A excitação dos nociceptores da ATM por estes compostos aumenta a liberação de CGRP e SP, resultando em edema articular, vermelhidão, aumento de temperatura, alodinia (dor provocada por estímulo não nocivo) e hiperalgesia (aumento da intensidade da dor associada a estímulo nocivo leve; Cairns, 2010; Kaneyama et al., 2007; Rang et al., 2011).

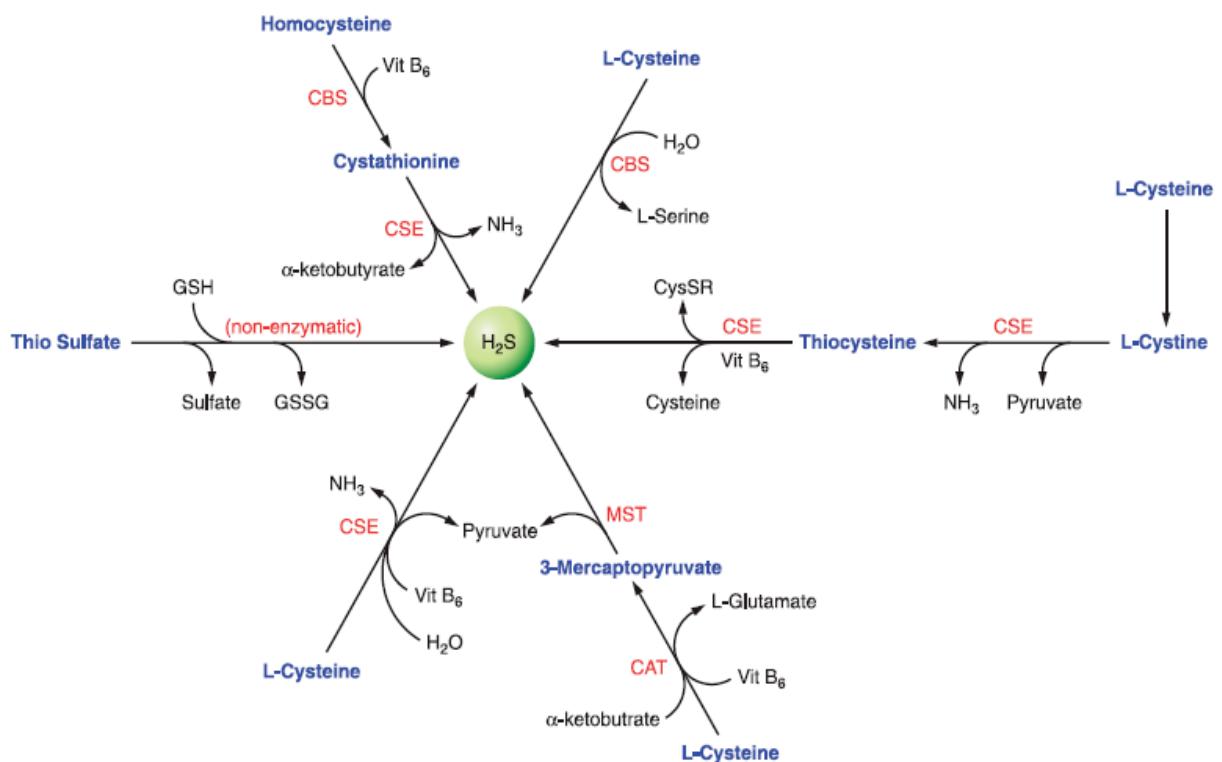
#### **1.4 Sulfeto de hidrogênio**

O sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) é uma molécula sinalizadora que desempenha importantes funções na manutenção da homeostase dos sistemas biológicos. Como outros membros da mesma família (NO e monóxido de carbono - CO), o H<sub>2</sub>S foi primeiramente reconhecido como um gás nocivo e tóxico ao meio ambiente. Atualmente sabe-se que essa molécula é produzida por enzimas presentes em mamíferos e modula uma série de processos fisiológicos (Calvert et al., 2010, Kolluru, 2013; Whiteman, Winyard et al., 2011). Este gasotransmissor atua na regulação do sistema nervoso e cardiovascular, apoptose, ciclo celular e estresse oxidativo. Tem ainda ação cardioprotetora e pode modular processos inflamatórios, nociceptivos, a função gastrointestinal, mitocondrial e o metabolismo energético (Kabil et al., 2014; Olas, 2015; Whiteman, Winyard, 2011).

Trata-se de uma molécula altamente lipofílica e, portanto, penetra facilmente a bicamada lipídica das membranas celulares. O H<sub>2</sub>S é um ácido fraco que em solução aquosa encontra-se em equilíbrio: H<sub>2</sub>S ↔ HS<sup>-</sup> ↔ S<sup>2-</sup>. Sendo que praticamente não há ânion sulfeto S<sup>2-</sup> em tecidos biológicos e existem quantidades aproximadamente iguais de H<sub>2</sub>S e HS<sup>-</sup> dentro da célula, e cerca de 20% de H<sub>2</sub>S e 80% de HS<sup>-</sup> no fluido extracelular e plasma a 37 °C e pH 7,4 (Kolluru et al., 2013; Wang, 2012).

O H<sub>2</sub>S é sintetizado endogenamente por ação das enzimas cistationina γ-liase (CSE), cistationina β-sintetase (CBS) e 3-mercaptopiruvato sulfotransferase (3MST). As enzimas CBS e CSE metabolizam cisteína e/ ou homocisteína para liberar H<sub>2</sub>S,

enquanto a 3MST gera H<sub>2</sub>S a partir do 3-mercaptopiruvato (3MP), que é produzido pela ação da enzima cisteína aminotrasferase (CAT) sobre a cisteína e o α-acetoglutarato (Figura 2; Stipanuk, Beck, 1982; Kimura, 2012; Wang, 2012). Essas enzimas estão amplamente distribuídas no organismo, sendo que a CBS é predominantemente encontrada no cérebro, sistema nervoso e fígado, enquanto a CSE é encontrada principalmente na vasculatura e no fígado e a 3-MST pode ser encontrada no cérebro e vasculatura (Calvert et al., 2010). Quantidades menos significativas de H<sub>2</sub>S também podem ser produzidas a partir de fontes não enzimáticas (Wang, 2012).



**Figura 2: Principais vias para síntese de H<sub>2</sub>S:** L-cisteína é o principal substrato para geração de sulfeto de hidrogênio a partir da CBS, CSE e da via CAT/3MST. FONTE: Wang (2012)

O H<sub>2</sub>S é metabolizado na mitocôndria, onde é primeiramente oxidado a persulfato pela enzima sulfeto quinona oxireduktase (SQR). O segundo passo dessa via consiste na conversão do persulfato a sulfito, pela persulfato dioxigenase, e em seguida a tiosulfato, pela rhodanese (Kabil, Banerjee, 2014; Kimura, 2014a; Stein, Bailey, 2013). No citosol o H<sub>2</sub>S sofre metilação pela enzima tiol-S-metiltransferase, originando metanotiol que, por sua vez, é metilado mais lentamente pela mesma enzima formando dimetilsulfeto. Por ser um agente redutor, pode ser consumido por

espécies oxidantes endógenas na vasculatura, tais como peroxinitrito, ânion superóxido, e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$  - Chang et al., 2008; Whiteman et al., 2004). E também pode ser eliminado do plasma mediante reação com a metahemoglobina, uma forma de hemoglobina que não se liga ao oxigênio, formando sulfemoglobina (Li et al., 2011; Wang, 2012). O  $H_2S$  e seus metabólitos são excretados na urina, respiração, fezes e flatulências e o equilíbrio entre a produção e a depuração do  $H_2S$  determina a sua concentração celular (Kimura, 2014a; Wang, 2012).

### **1.5 Sulfeto de hidrogênio na inflamação e nocicepção**

Diversos estudos *in vivo* e *in vitro* fornecem evidências de que o  $H_2S$  desempenha um papel importante como modulador nos processos inflamatórios e nociceptivos em vários tecidos, atuando em múltiplos alvos. Apesar disso, o papel do  $H_2S$  nesses processos parece promissor, mas ainda controverso, visto que alguns estudos demonstram papel anti-inflamatório e antinociceptivo (Ekundi-Valentim et al., 2010; Li et al., 2009; Zanardo et al., 2006), enquanto outros sugerem efeito pró-inflamatório e algésico (Li et al., 2005; Zhang et al., 2010).

Evidências experimentais têm demonstrado que o  $H_2S$  atua como um fator pró-inflamatório em vários modelos animais, incluindo edema de pata (Bhatia et al., 2005a), pancreatite (Bhatia et al., 2005b; Nishimura et al., 2009), endotoxemia (Kimura, 2000), e sepse (Zhang et al., 2006). Tem efeito pró-nociceptivo quando administrado por via intratecal (Maeda et al., 2009), intraplantar (Kawabata et al., 2007) ou intracolônica (Matsunami et al., 2009).

Kloesch et al. (2012) observaram que altas concentrações de  $H_2S$  atuam como um potente indutor da expressão de uma série de mediadores pró-inflamatórios, como IL-6, IL-8 e COX-2 em células FLS derivadas de pacientes com artrite reumatóide. Além disso,  $H_2S$  também elevou a expressão de metaloproteinases envolvidas na degradação da matriz extracelular na artrite.

Maeda et al. (2009) demonstram que a injeção intraplantar de hidrossulfeto de sódio (NaHS), um doador de  $H_2S$ , na pata traseira de ratos, provoca hiperalgesia mecânica. Este mesmo doador também induz inflamação tecidual, evidenciada pelo aumento da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), marcador da infiltração tecidual de neutrófilos (Li et al., 2005). Outro estudo ressalta que a inibição da

síntese endógena de H<sub>2</sub>S utilizando DL-propargilglicina (PGly), um inibidor irreversível da CSE, reduz o edema de pata induzido por carragenina (CGN; Bhatia et al., 2005a).

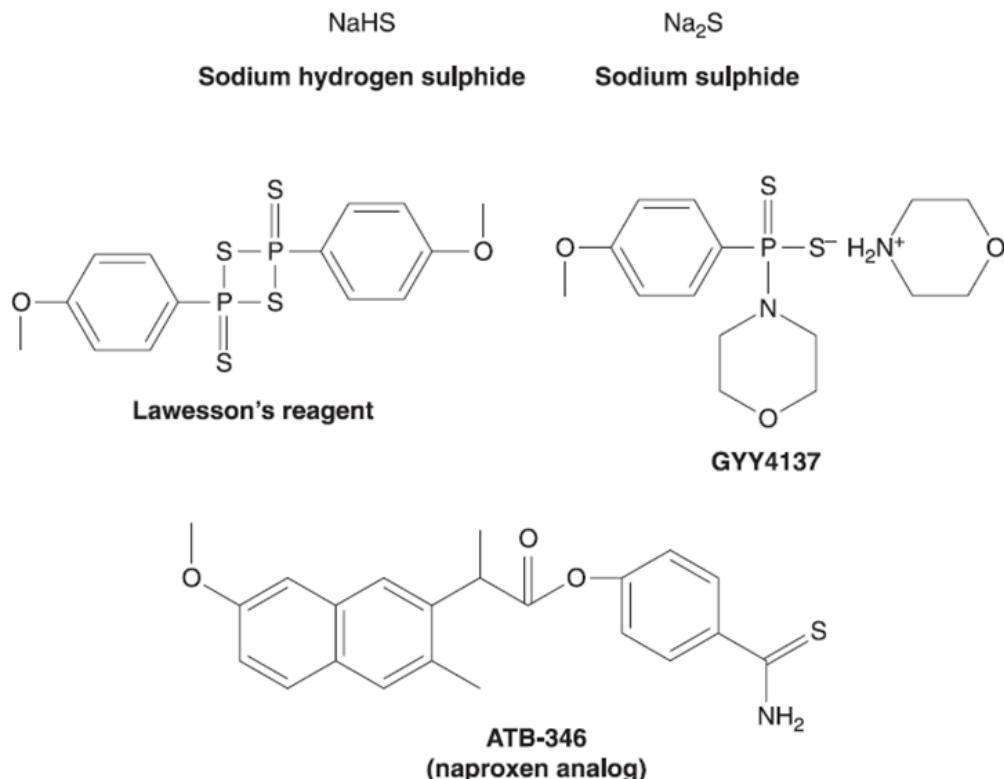
Por outro lado, as propriedades anti-inflamatórias do H<sub>2</sub>S têm sido observadas em diversos modelos experimentais, tais como o de edema de pata induzido por CGN (Zanardo et al., 2006), artrite (Ekundi-Valentim et al., 2010; Li et al., 2013), lesão pulmonar (Esechie et al., 2008), asma (Benetti et al., 2013) e em modelo de dor vicular induzida por distensão colorectal (Distrutti et al., 2010).

Estudos comprovam que este gasotransmissor possui um efeito antiproliferativo em linfócitos T e induz apoptose de células polimorfonucleares. Esses efeitos limitam o desenvolvimento da inflamação (Wang et al., 2012). Zanardo et al. (2006) demonstraram que a injeção dos doadores de H<sub>2</sub>S, NaHS e sulfeto de sódio (Na<sub>2</sub>S), inibiram a infiltração leucocitária e a aderência ao endotélio vascular, bem como a formação de edema na pata traseira de ratos. Além disso, em modelo de artrite aguda induzida por kaolin/CGN no joelho de camundongos, Na<sub>2</sub>S inibiu a adesão leucocitária nas vênulas, sugerindo papel anti-inflamatório do H<sub>2</sub>S neste modelo de artrite (Fox et al., 2012).

A utilização de moléculas doadoras de H<sub>2</sub>S derivadas de anti-inflamatórios não esteróides (AINES), também vem apresentando resultados promissores. A administração de ATB-346, um doador de H<sub>2</sub>S derivado do naproxeno, evidenciou atividade anti-inflamatória na sinovite induzida por CGN no joelho de ratos e foi capaz de reduzir os efeitos gástricos deletérios do naproxeno (Ekundi-Valentim et al., 2013). Doadores de H<sub>2</sub>S derivados do diclofenaco também exibiram atividade anti-inflamatória em modelo de choque endotóxico e no edema de pata induzido pela CGN (Li et al., 2007; Sidhpuriwala et al., 2007; Wallace et al., 2007).

Os resultados contraditórios reportados na literatura podem ser decorrentes da utilização de diferentes concentrações de H<sub>2</sub>S, vias de administração e modelos animais. É possível observar este efeito ambíguo na sinalização inflamatória com o tratamento de macrófagos com LPS, onde baixas concentrações de H<sub>2</sub>S inibem a síntese de PGE<sub>2</sub>, NO, IL-1β, IL-6 e a atividade de NF-κB, mas altas concentrações promovem a síntese de mediadores pró-inflamatórios (Whiteman et al., 2010). A utilização de diferentes rotas de administração também exerce influência sobre as ações do H<sub>2</sub>S. Matsunami et al. (2009), avaliando o papel do H<sub>2</sub>S na nocicepção, demonstraram que a administração intracolônica de NaHS induz comportamento

nociceptivo visceral em camundongos, acompanhado por hiperalgesia e alodinia abdominal. No entanto, a administração intraperitoneal desse doador não afetou a sensibilidade vicular.



**Figura 3: Estrutura química de alguns doadores de H<sub>2</sub>S.** Hidrossulfeto de sódio, sulfeto de sódio e reagente de Lawesson são doadores de H<sub>2</sub>S de liberação rápida, GYY-4137 é um doador de liberação lenta e o ATB-346 é um doador híbrido derivado do naproxeno. FONTE: Modificado de Wang (2012).

Ademais, o emprego de diferentes tipos de doadores de H<sub>2</sub>S pode resultar em respostas pró ou anti-inflamatórias (Wedmann et al., 2014). Neste sentido, a introdução recente de doadores de H<sub>2</sub>S de liberação lenta (p. ex. GYY-4137) vem promovendo resultados mais consistentes e promissores quanto às ações anti-inflamatórias desse gasotransmissor (Li et al., 2013; Whiteman et al., 2011; Whiteman, Winyard, 2011). Enquanto a liberação de H<sub>2</sub>S a partir do NaHS é espontânea e rápida, a liberação de H<sub>2</sub>S pelo composto GYY-4137 ocorre de forma lenta (e assim durante longos períodos de tempo), possivelmente mimetizando a cinética de produção endógena do H<sub>2</sub>S (Whiteman et al., 2010).

Os mecanismos celulares e moleculares envolvidos nos efeitos farmacológicos do H<sub>2</sub>S ainda não estão estabelecidos de forma precisa, embora os dados existentes indiquem diversos alvos. Vários autores observaram que a

ativação de canais de  $K^+$  dependentes de ATP ( $K_{ATP}$ ) parece ser a principal via responsável pelo efeito anti-inflamatório do  $H_2S$ , uma vez que esses efeitos foram revertidos pela glibenclamida, um bloqueador deste canal (Cunha et al., 2008; Donatti et al., 2014; Zanardo et al., 2006). Os canais de  $Ca^{2+}$  tipo T, por sua vez, são geralmente relacionados com os efeitos pró-inflamatórios e pró-nociceptivos deste mediador (Maeda et al., 2009; Schemann, Grundy, 2009). Além disso, uma série de outros canais podem ser modulados pelo  $H_2S$ , como o  $K_{Ca}$  (canal de  $K^+$  ativado por  $Ca^{2+}$ ), canais de  $Ca^{2+}$  tipo L e os receptores de potencial transitório (TRPs) TRPA1 e TRPV1 (Streng et al., 2008; Sun et al., 2008; Telezhkin et al., 2009; Trevisani et al., 2005).

O  $H_2S$  ainda possui a habilidade de modular a expressão de genes para uma série de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e outras enzimas, que tem sido associada ao seu efeito sobre fatores de transcrição, como o NF- $\kappa$ B e o Nrf2 (Wallace et al., 2012, 2015). Estudos sugerem que a administração de diferentes doadores de  $H_2S$  reduz a ativação do NF- $\kappa$ B, resultando na inibição da expressão de iNOS e COX-2, bem como dos níveis de PGE<sub>2</sub> e TNF- $\alpha$ , e leva ao aumento da expressão do Nrf2, fator responsável pela maior expressão de enzimas antioxidantes (Kimura, 2014b; Oh et al., 2006; Whiteman et al., 2010).

## 1.6 Justificativa

As DTMs são importantes problemas de saúde pública e têm um alto impacto na qualidade de vida dos indivíduos acometidos. Sendo assim, o tratamento adequado para o controle efetivo da dor, bem como da progressão da doença é fundamental (Dahlström, Carlsson, 2010).

Embora existam medicamentos disponíveis para o tratamento dessas disfunções, estes muitas vezes não são efetivos ou exercem inúmeros efeitos adversos. Nesse contexto, pode ocorrer a progressão da doença e a utilização de métodos terapêuticos invasivos e não reversíveis, aumentando o risco de cronificação da inflamação (Liu, Steinkeler, 2013). Deste modo, o desenvolvimento de novas opções terapêuticas mais eficazes, bem como estudos de mecanismos fisiopatológicos são necessários.

Neste sentido, diversos estudos, inclusive do nosso grupo, têm demonstrado o papel anti-inflamatório e antinociceptivo do  $H_2S$  em modelos de inflamação

articular (Ekundi-Valentim et al., 2010; 2013). Dentre os diferentes tipos de doadores de H<sub>2</sub>S, estudos vêm demonstrando que o composto GYY-4137 possui um papel bastante promissor. A ação anti-inflamatória e protetora deste doador foi observada em modelo de inflamação evocada por LPS em cultura de sinoviócitos e condrócitos humanos (Li et al., 2013), inflamação articular induzida por CFA (Li et al., 2013), cultura de macrófagos RAW264.7 tratados com LPS (Whiteman et al., 2011) e em modelo de miocardite causada por infecção por vírus Coxsackie tipo B3 em cardiomiócitos de ratos (Wu et al., 2015).

Sendo assim, acreditou-se ser pertinente aprofundar esse conhecimento, testando o doador de H<sub>2</sub>S, GYY-4137, no modelo *in vivo* de sinovite aguda induzida por CGN na ATM de ratos, bem como investigar os mecanismos envolvidos em seus efeitos.

## 1.7 Objetivos

Os objetivos deste projeto foram avaliar o efeito do tratamento com o doador de H<sub>2</sub>S, GYY-4137, na sinovite induzida por CGN na articulação temporomandibular de ratos e caracterizar farmacologicamente os possíveis mecanismos envolvidos.

### Estratégias:

- I. Caracterizar a sinovite na ATM de ratos em resposta à injeção intra-articular de CGN;
- II. Observar o efeito do tratamento com o composto doador de H<sub>2</sub>S, GYY-4137, sobre a nocicepção;
- III. Verificar a capacidade deste doador de modular a produção de mediadores/marcadores inflamatórios, como citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10) e metaloproteinases de matriz (MMP-2 e 9);
- IV. Avaliar o efeito deste mesmo tratamento sobre o influxo celular na cavidade articular, atividade da enzima MPO e atividade de algumas enzimas antioxidantes (catalase, superóxido dismutase, glutationa peroxidase, glutationa redutase e glutationa S-transferase);
- V. Caracterizar os mecanismos envolvidos na ação do H<sub>2</sub>S neste modelo.

## 5 CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados no presente trabalho, podemos afirmar que:

- a indução da sinovite de ATM pela injeção i. art. de CGN leva a alodinia mecânica, recrutamento de neutrófilos na cavidade (e a consequente infiltração tecidual de neutrófilos) e aumento da produção das citocinas IL-1 $\beta$  e IL-6;
- a co-administração do doador de H<sub>2</sub>S de liberação lenta, GYY-4137, na dose de 2,5 mg/cavidade resulta em redução da alodinia mecânica e da infiltração tecidual de neutrófilos;
- nesta dose, porém, o GYY-4137 não é capaz de reduzir a produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6, elevadas em resposta à CGN;
- a ação anti-inflamatória e antinociceptiva do GYY-4137 neste modelo de sinovite aguda não parece estar relacionada com enzimas antioxidantes ou metaloproteinases de matriz (MMP-2 e -9);
- a ativação de canais K<sub>ATP</sub> e GMPc parecem mediar o efeito antinociceptivo do GYY-4137;
- a infiltração de neutrófilos para a cavidade articular parece ser dependente do GMPc derivado da enzima GCs.

## REFERÊNCIAS\*

- Afonso V, Champy R, Mitrovic D, Collin P, Lomri A. Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. *Joint Bone Spine.* 2007;74:324-9.
- Aida Y, Maeno M, Suzuki N, Namba A, Motohashi M, Matsumoto M, Makimura M, Matsumura H. The effect of IL-1beta on the expression of inflammatory cytokines and their receptors in human chondrocytes. *Life Science.* 2006;79:764-71.
- Alpaslan C, Bilgihan A, Alpaslan GH, Güner B, Ozgür Yis M, Erbaş D. Effect of arthrocentesis and sodium hyaluronate injection on nitrite, nitrate and thiobarbituric acid-reactive substance levels in the synovial fluid. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology & Endodontics.* 2000;89:686.
- Alstergren P, Kopp S. Prostaglandin E<sub>2</sub> in temporomandibular joint synovial fluid and its relation to pain and inflammatory disorders. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery.* 2000;58:180-6.
- Alves DP, da Motta PG, Romero TR, Klein A, Duarte ID. NO/cGMP production is important for the endogenous peripheral control of hyperalgesia during inflammation. *Nitric Oxide.* 2013;28:8-13.
- Alvez CS, Moraes LOC, Marques SR, Tedesco RC, Harb LJC, Rodríguez-Vázquez JF, Mérida-Velasco JR, Alonso LG. Analysis by light, scanning, and transmission microscopy of the intima synovial of the temporomandibular joint of human fetuses during the development. *Anatomy Research International.* 2014.
- Anuar F, Whiteman M, Bhatia M, Moore PK. Flurbiprofen and its nitric oxide-releasing derivative protect against septic shock in rats. *Inflammation Research.* 2006;55(11):498-503.
- Arinci A, Ademoglu E, Aslan A, Mutlu-Turkoglu U, Karabulut AB, Karan A. Molecular correlates of temporomandibular joint disease. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology & Endodontics.* 2005;99:666-70.
- Asomoza-Espinosa R, Alonso-López R, Mixcoatl-Zecuatl T, Aguirre-Bañuelos P, Torres-López JE, Granados-Soto V. Sildenafil increases diclofenac antinociception in the formalin test. *European Journal of Pharmacology.* 2001;418(3):195-200.
- Avery JK. Desenvolvimento e histologia bucal, 3th ed. São Paulo, Porto Alegre: Artmed. 2005:373-83.

---

\*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2014 set 02]. Available from: <http://www.icb.usp.br/~sbibicb/images/diretrizesVancouver2012sbibPDF/Manual%20%20Vancouver%20Compacto.pdf>

Bagis B, Aydogan EA, Turgut S, Durkan R, Özcan M. Gender difference in prevalence of signs and symptoms of temporomandibular joint disorders: a retrospective study on 243 consecutive patients. International Journal of Medical Sciences. 2012;9(7):539-44.

Bath-Balogh M, Fehrenbach M J. Anatomia, histologia e embriologia dos dentes e das estruturas orofaciais, 2th ed. São Paulo: Manole. 2008:325-33.

Benetti LR, Campos D, Gurgueira SA, Vercesi AE, Guedes CE, Santos KL, Wallace JL, Teixeira SA, Florenzano J, Costa SK, Muscará MN, Ferreira HH. Hydrogen sulfide inhibits oxidative stress in lungs from allergic mice in vivo. European Journal of Pharmacology. 2013;698(1-3):463-9.

Beurden SPA, Hoff VJW. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. BioTechniques. 2005;38(1):73-83.

Bhatia M, Sidhpuriwala J, Moochhala SM, Moore PK. Hydrogen sulfide is a mediator of carrageenan-induced hindpaw oedema in the rat. British Journal of Pharmacology. (2005a);145:141-4.

Bhatia M, Wong FL, Fu D, Lau HY, Moochhala SM, Moore PK. Role of hydrogen sulfide in acute pancreatitis and associated lung injury. The FASEB Journal. (2005b);19:623-5.

Biasotto-Gonzalez DA. Abordagem interdisciplinar das disfunções temporomandibulares, 2th ed. Manole. 2005:1-17,43-65.

Bouloux GF. Temporomandibular joint pain and synovial fluid analysis: a review of the literature. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery. 2009; 67:2497-04.

Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. Journal of Investigative Dermatology. 1982;78(3):206-9.

Brock SC, Tonussi CR. Intrathecally injected morphine inhibits inflammatory paw edema: the involvement of nitric oxide and cyclic-guanosine monophosphate. Anesth Analg. 2008;106(3):965-71.

Bucci M, Papapetropoulos A, Vellecco V, Zhou Z, Pyriochou A, Roussos C, Roviezzo F, Brancaleone V, Cirino G. Hydrogen sulfide is an endogenous inhibitor of phosphodiesterase activity. Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology Journal. 2010;30:1998-2004.

Burguera EF, Vela-Anero A, Magalhães J, Meijide-Faílde R, Blanco FJ. Effect of hydrogen sulfide sources on inflammation and catabolic markers on interleukin 1b-stimulated human articular chondrocytes. Osteoarthritis and Cartilage. 2014;22(7):1026-35.

Cairns BE, Sessle BJ, Hu JW. Characteristics of glutamate evoked temporomandibular joint afferent activity in the rat. *Journal of Neurophysiology*. 2001;85:2446-54.

Cairns BE. Nociceptors in the orofacial region (temporomandibular joint and masseter muscle). In: Schmidt R F, Willis W D, eds. *Encyclopedic reference of pain*. Heidelberg, Germany: Springer-Verlag; 2006;14:2261-4.

Cairns BE. Pathophysiology of TMD pain - basic mechanisms and their implications for pharmacotherapy. *Journal of Oral Rehabilitation*. 2010;37(6):391-410.

Calvert JW, Coetzee WA, Lefer DJ. Novel insights into hydrogen sulfide-mediated cytoprotection. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2010;12(10):1203-17.

Carlberg I, Mannervik B. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *The Journal of Biological Chemistry*. 1975;260(14):5470-80.

Carleson J, Alstergren P, Appelgren A, Appelgren B, Kopp S, Srinivasan GR, Theodorsson E, Lundeberg T. Effects of adjuvant on neuropeptide-like immunoreactivity in experimentally induced temporomandibular arthritis in rats. *Archives of Oral Biology*. (1996a);41(7):705-12.

Carleson J, Alstergren P, Appelgren A, Appelgren B, Kopp S, Theodorsson E, Lundeberg T. A model for the study of experimentally induced temporomandibular arthritis in rats: the effect of human recombinant interleukin-1 $\alpha$  on neuropeptide-like immunoreactivity. *Journal of Orofacial Pain*. (1996b);10(1):9-14.

Chang L, Geng B, Yu F, Zhao J, Jiang H, Du J, Tang C. Hydrogen sulfide inhibits myocardial injury induced by homocysteine in rats. *Amino Acids*. 2008;34:573-85.

Clemente-Napimoga JT, Pellegrini-da-Silva A, Ferreira VHA, Napimoga MH, Parada CA, Tambeli CH. Gonadal hormones decrease temporomandibular joint  $\kappa$ -mediated antinociception through a down-regulation in the expression of kappa opioid receptors in the trigeminal ganglia. *European Journal of Pharmacology*. 2009;617:41-7.

Cunha TM, Dal-Secco D, Verri WA Jr, Guerrero AT, Souza GR, Vieira SM, Lotufo CM, Neto AF, Ferreira SH, Cunha FQ. Dual role of hydrogen sulfide in mechanical inflammatory hypernociception. *European Journal of Pharmacology*. 2008;20(1-3): 127-35.

Dahlström L, Carlsson GE. Temporomandibular disorders and oral health-related quality of life. *Acta Odontologica Scandinavica*. 2010;68:80-5.

Déciga-Campos M, López-Muñoz FJ. Participation of the L-arginine-nitric oxide-cyclic GMP-ATP-sensitive K $^{+}$  channel cascade in the antinociceptive effect of rofecoxib. *European Journal of Pharmacology*. 2004;484(2-3):193-9.

Denadai-Souza A, Camargo LL, Ribela MTCP, Keeble JE, Costa SKP, Muscará MN. Participation of peripheral tachykinin NK1 receptors in the carrageenan-induced inflammation of the rat temporomandibular joint. European Journal of Pain. 2009;13:812-19.

Denadai-Souza A, Cenac N, Casatti CA, de Souza Câmara PR, Yshii LM, Costa SK P, Vergnolle N, Muscará MN. PAR<sub>2</sub> and Temporomandibular Joint Inflammation in the Rat. Journal of Dental Research. 2010;89(10):1123-8.

Denadai-Souza A, Martin L, de Paula MA, de Avellar MC, Muscará MN, Vergnolle N, Cenac N. Role of transient receptor potential vanilloid 4 in rat joint inflammation. Arthritis & Rheumatology. 2012;64(6):1848-58.

Distrutti E, Cipriani S, Renga B, Mencarelli A, Migliorati M, Cianetti S, Fiorucci S. Hydrogen sulphide induces  $\mu$  opioid receptor-dependent analgesia in a rodent model of visceral pain. Molecular Pain. 2010;6:36.

Donatti AF, Araujo RM, Soriano RN, Azevedo LU, Leite-Panissi CA, Branco LGS. Role of hydrogen sulfide in the formalin-induced orofacial pain in rats. European Journal of Pharmacology. 2014;738:49-56.

Ekundi-Valentim E, Mesquita FP, Santos KT, de Paula MA, Florenzano J, Zanoni CI, Rodrigues L, de Nucci G, Teixeira SA, Ferreira HH, Wallace JL, Costa SK, Muscará MN. A comparative study on the anti-inflammatory effects of single oral doses of naproxen and its hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S)-releasing derivative ATB-346 in rats with carrageenan-induced synovitis. Medical Gas Research. 2013;3(1):24.

Ekundi-Valentim E, Santos KT, Camargo EA, Denadai-Souza A, Teixeira SA, Zanoni CI, Grant AD, Wallace J, Muscará MN, Costa SK. Differing effects of exogenous and endogenous hydrogen sulphide in carrageenan-induced knee joint synovitis in the rat. British Journal of Pharmacology. 2010;159(7):1463-74.

Esechie A, Kiss L, Olah G, Horváth EM, Hawkins H, Szabo C, Traber DL. Protective effect of hydrogen sulfide in a murine model of acute lung injury induced by combined burn and smoke inhalation. Clinical Science (London). 2008;115(3):91-7.

Faro MLL, Fox B, Whatmore JL, Winyard PG, Whiteman M. Hydrogen sulfide and nitric oxide interactions in inflammation. Nitric Oxide. 2014;41:38-47.

Feldmann M, Brennan FM, Williams RO, Woody JN, Maini RN. The transfer of a laboratory based hypothesis to a clinically useful therapy: the development of anti-TNF therapy of rheumatoid arthritis. Best Practice & Research Clinical Rheumatology. 2004;18(1):59-80.

Fiorentino PM, Cairns BE, Hu JW. Development of inflammation after application of mustard oil or glutamate to the rat temporomandibular joint. Archives of Oral Biology. 1999;44(1):27-32.

Fossati P, Prencipe L, Berti G. Use of 3, 5-dichloro- 2-hydroxybenzenesulfonic acid/4-aminophenazone chromogenic system in direct enzymic assay of uric acid in serum and urine. Clinical Chemistry. 1980;26(2):227-31.

Fox B, Schantz JT, Haigh R, Wood ME, Moore PK, Viner N, Spencer JP, Winyard PG, Whiteman M. Inducible hydrogen sulfide synthesis in chondrocytes and mesenchymal progenitor cells: is H<sub>2</sub>S a novel cytoprotective mediator in the inflamed joint? Journal of Cellular and Molecular Medicine. 2012;(4):896-910.

Furquim BD, Flamengui LMSP, Conti PCR. TMD and chronic pain: A current view. Dental Press Journal of Orthodontics. 2015;20(1):127-33.

Gulen H, Ataoglu H, Haliloglu S, Isik K. Proinflammatory cytokines in temporomandibular joint synovial fluid before and after arthrocentesis. Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology & Endodontics. 2009;107:e1-e4.

Haas DA, Nakanishi O, MacMillan RE, Jordan RC, Hu JW. Development of an orofacial model of acute inflammation in the rat. Archives of Oral Biology. 1992;37(5):417-22.

Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S- transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. Journal of Biological Chemistry. 1974;249(22):7130-9.

Hardy MM, Seibert K, Manning PT, Currie MG, Woerner BM, Edwards D, Koki A, Tripp CS. Cyclooxygenase 2-dependent prostaglandin E2 modulates cartilage proteoglycan degradation in human osteoarthritis explants. Arthritis & Rheumatology. 2002;46(7):1789-3.

Hitchon CA, El-Gabalawy HS. Oxidation in rheumatoid arthritis. Arthritis Research & Therapy 2004;6(6):265-78.

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. Archives of Oral Biology. 2001;46:93-7.

Israel HA, Langevin CJ, Singer MD, Behrman DA. The relationship between temporomandibular joint synovitis and adhesions: pathogenic mechanisms and clinical implications for surgical management. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery. 2006;64:1066-74.

Iwanaga T, Shikichi M, Kitamura H, Yanase H, Nozawa-Inoue K. Morphology and functional roles of synoviocytes in the joint. Archives of Histology and Cytology. 2000;63(1):17-31.

Jiang B, Tang G, Cao K, Wu L, Wang R. Molecular mechanism for H(2)S-induced activation of K(ATP) channels. Antioxid Redox Signal. 2010;12(10):1167-78.

- Kabil O, Banerjee R. Enzymology of H<sub>2</sub>S biogenesis, decay and signaling. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2014;20(5):770-82.
- Kabil O, Motl N, Banerjee R. H<sub>2</sub>S and its role in redox signaling. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2014;1844(8):1355-66.
- Kaneyama K, Segami N, Sato J, Fujimura K, Nagao T, Yoshimura H. Prognostic factors in arthrocentesis of the temporomandibular joint: comparison of bradykinin, leukotriene B<sub>4</sub>, prostaglandin E<sub>2</sub>, and substance P level in synovial fluid between successful and unsuccessful cases. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2007;65:242-7.
- 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. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2004;42:246-50.
- Kardel R, Ulfgren A-K, Reinholt FP, Holmlund A. Inflammatory cell and cytokine patterns in patients with painful clicking and osteoarthritis in the temporomandibular joint. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2003;32:390-6.
- Kawabata A, Ishiki T, Nagasawa K, Yoshida S, Maeda Y, Takahashi T, Sekiguchi F, Wada T, Ichida S, Nishikawa H. Hydrogen sulfide as a novel nociceptive messenger. *Pain*. 2007;132:74-81.
- Kerins C, Carlson D, McIntosh J, Bellinger L. A role for cyclooxygenase II inhibitors in modulation temporomandibular joint inflammation from a meal pattern analysis perspective. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2004;62:989-95.
- Kim YK, Kim SG, Kim BS, Lee JY, Yun PY, Bae JH, Oh JS, Ahn JM, Kim JS, Lee SY. Analysis of the cytokine profiles of the synovial fluid in a normal temporomandibular joint: Preliminary study. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery*. 2012;40:337-41.
- Kimura H. Hydrogen sulfide and polysulfides as biological mediators. *Molecules*. 2014a;19(10):16146-57.
- Kimura H. Hydrogen sulfide induces cyclic AMP and modulates the NMDA receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2000;267:129-33.
- Kimura H. Metabolic turnover of hydrogen sulfide. *Frontiers in physiology*. 2012;101(3):1-3.
- Kimura H. Production and physiological effects of hydrogen sulfide. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2014b;20(5):783-93.
- Kloesch B, Liszt M, Krehan D, Broell J, Kiener H, Steiner G. High concentrations of hydrogen sulphide elevate the expression of a series of pro-inflammatory genes in fibroblast-like synoviocytes derived from rheumatoid and osteoarthritis patients. *Immunology Letters*. 2012;141(2):197-203.

Kojima F, Naraba H, Miyamoto S, Beppu M, Aoki H, Kawai S. Membrane-associated prostaglandin E synthase-1 is upregulated by proinflammatory cytokines in chondrocytes from patients with osteoarthritis. *Arthritis Research & Therapy*. 2004;6(4):R355-65.

Kolluru GK, Shen X, Bir SC, Kevil CG. Hydrogen sulfide chemical biology: Pathophysiological roles and detection. *Nitric Oxide*. 2013;35:5-20.

Kostrzewska-Janicka J, Mierzwinska-Natalska E, Jurkowski P, Okonski P, Nedzi-Gora M. Assessment of temporomandibular Joint Disease. *Neurobiology of respiration, Advances in experimental medicine and biology*. 2013;788:207-11.

Kristensen KD, Alstergren P, Stoustrup P, Küseler A, Herlin T, Pedersen K. Cytokines in healthy temporomandibular joint synovial fluid. *Journal of Oral Rehabilitation*. 2014;41:250-56.

Kuntze KB, Antonio RC, Izidoro-Toledo TC, Meschiari CA, Tanus-Santos JE, Gerlach RF. Captopril and Lisinipril only inhibit matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) activity at millimolar concentrations. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 2014;114:233-9.

Lázaro-Ibáñez GG, Torres-López JE, Granados-Soto V. Participation of the nitric-cyclic GMP-ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel pathway in the antinociceptive action of ketorolac. *European Journal of Pharmacology*. 2001;426:39-44.

Lee MJ, Han KJ, Kwon HJ, Jung HS, Cho SW. Effects of hyaluronan on carrageenan-induced synovitis in rat TMJ. *Anatomy & Cell Biology*. 2010;43(2):125-31.

Li L, Bhatia M, Zhu YZ, Zhu YC, Ramnath RD, Wang ZJ, Anuar FB, Whiteman M, Salto-Tellez M, Moore PK. Hydrogen sulfide is a novel mediator of lipopolysaccharide-induced inflammation in the mouse. *The FASEB Journal*. 2005;19(9):1196-8.

Li L, Fox B, Keeble J, Salto-Tellez M, Winyard PG, Wood ME, Moore PK, Whiteman M. The complex effects of the slow-releasing hydrogen sulfide donor GYY4137 in a model of acute joint inflammation and in human cartilage cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2013;17(3):365-76.

Li L, Rose P, Moore PK. Hydrogen sulfide and cell signaling. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2011;51:169-87.

Li L, Rossoni G, Sparatore A, Lee LC, Del Soldato P, Moore PK. Anti-inflammatory and gastrointestinal effects of a novel diclofenac derivative. *Free Radical Biology and Medicine*. 2007;42:706-19.

Li L, Salto-Tellez M, Tan CH, Whiteman M, Moore PK. GYY4137, a novel hydrogen sulfide-releasing molecule, protects against endotoxic shock in the rat. *Free Radical Biology & Medicine*. 2009;47:103-13.

Liu F, Steinkeler A. Epidemiology, diagnosis, and treatment of temporomandibular disorders. *Dental Clinics of North America.* 2013;57:465-79.

Lone BA. MMP-9, MMP-2 Profile in different mice tissues and LPS induced MMP-9 and MMP-2 expression in RAW 264.7 cells, down regulated by Emodin treatment. *International Journal of Interdisciplinary and Multidisciplinary Studies (IJIMS).* 2014;1(9):1-7.

Lv X, Li Q, Wu S, Sun J, Zhang M, Chen Y J. Psychological stress alters the ultrastructure and increases IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in mandibular condylar cartilage. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 2012;45(10):968-76.

Madeira MC. Anatomia da face: bases anátomo funcionais para a prática de odontologia, 8th ed.. São Paulo: Sarvier. 2012:105-23.

Maeda Y, Aoki Y, Sekiguchi F, Matsunami M, Takahashi T, Nishikawa H, Kawabata A. Hyperalgesia induced by spinal and peripheral hydrogen sulfide: evidence for involvement of Cav3.2 T-type calcium channels. *Pain.* 2009;142:127-32.

Manfredini D, Guarda-Nardini L, Winocur E, Piccotti F, Ahlberg J, Lobbezoo F. Research diagnostic criteria for temporomandibular disorders: a systematic review of axis I epidemiologic findings. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2011;112:453-62.

Matsumoto K, Honda K, Ohshima M, Yamaguchi Y, Nakajima I, Micke P, Otsuka K. Cytokine profile in synovial fluid from patients with internal derangement of the temporomandibular joint: a preliminary study. *Dentomaxillofacial Radiology.* 2006;35:432-41.

Matsunami M, Tarui T, Mitani K, Nagasawa K, Fukushima O, Okubo K, Yoshida S, Takemura M, Kawabata A. Luminal hydrogen sulfide plays a pro-nociceptive role in mouse colon. *Gut.* 2009;58:751-61.

Miller MS. Phosphodiesterase inhibition in the treatment of autoimmune and inflammatory diseases: current status and potential. *Journal of Receptor, Ligand and Channel Research.* 2015;8:19-30.

Mizui T, Ishimaru JI, Miyamoto K, Kurita K. Matrix metalloproteinase-2 in synovial lavage fluid of patients with disorders of the temporomandibular joint. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery.* 2001; 39: 310-4.

Mustafa AK, Gadalla MM, Sen N, Kim S, Mu W, Gazi SK, Barrow RK, Yang G, Wang R, Snyder SH. H<sub>2</sub>S signals through protein S-sulphydrylation. *Science Signaling.* 2009;2(96):ra72.

Nanci A. Tem Cate, Oral histology - Development, structure, and function, 7<sup>th</sup> ed. Mosby Elsevier. 2008:358-79.

Nascimento GC, Rizzi E, Gerlach RF, Leite-Panissi CRA. Expression of MMP-2 and MMP-9 in the rat trigeminal ganglion during the development of temporomandibular

joint inflammation. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 2013;46:956-67.

Navarro VP, Nelson-Filho P, Silva LAB, Freitas AC. A participação das metaloproteinases da matriz nos processos fisiopatológicos da cavidade bucal. *Revista de Odontologia da UNESP.* 2006;35(4):233-8.

Nishimura S, Fukushima O, Ishikura H, Takahashi T, Matsunami M, Tsujiuchi T, Sekiguchi F, Naruse M, Kamanaka Y, Kawabata A. Hydrogen sulfide as a novel mediator for pancreatic pain in rodents. *Gut.* 2009;58:762-70.

North Shore Oral and Maxillofacial Surgery, organization. [Internet]. Crows Nest, Austrália; Temporomandibular joint disease treatment, c2015 [update 2015 jan 15; cited 2015 jan 15]. Available from: <http://nsoms.com.au/procedures/temporomandibular-joint-disease-treatment/>.

Nozawa-Inoue K, Amizuka N, Ikeda N, Suzuki A, Kawano Y, Maeda T. Synovial membrane in the temporomandibular joint - its morphology, function and development. *Archives of Histology and Cytology.* 2003; 66 (4): 289-306.

Ogura N, Kondoh T. Molecular aspects in inflammatory events of temporomandibular joint: Microarray-based identification of mediators. *Japanese Dental Science Review.* 2014.

Oh GS, Pae HO, Lee BS, Kim BN, Kim JM, Kim HR, Jeon SB, Jeon WK, Chae HJ, Chung HT. Hydrogen sulfide inhibits nitric oxide production and nuclear factor-kappaB via heme oxygenase-1 expression in RAW264.7 macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *Free Radical Biology and Medicine.* 2006;41(1):106-19.

Okeson JP. Management of temporomandibular disorders and occlusion, 6<sup>th</sup> ed. Chicago: Quintessence. 2008:105-72.

Olas B. Hydrogen sulfide in signaling pathways. *Clinica Chimica Acta.* 2015;439:212-8.

Oliveira MC, Parada CA, Veiga MC, Rodrigues LR, Barros SP, Tambeli CH. Evidence for the involvement of endogenous ATP and P2X receptors in TMJ pain. *European Journal of Pain.* 2005;9:87-93.

Oliveira W. Disfunção temporomadibular. In: Paiva HJ. e colaboradores. Noções e conceitos básicos em oclusão, disfunção temporomandibular e dor orofacial. Livraria Santos Editora, 2008:215-28.

Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine.* 1967;70:158-69.

Pálinkás Z, Furtmüller PG, Nagy A, Jakopitsch C, Pirker KF, Magierowski M, Jasnos K, Wallace JL, Obinger C, Nagy P. Interactions of hydrogen sulfide with myeloperoxidase. *British Journal of Pharmacology.* 2015;172:1516-32.

Patterson AM, Schmutz C, Davis S, Gardner L, Ashton BA, Middleton J. Differential binding of chemokines to macrophages and neutrophils in the human inflamed synovium. *Arthritis Research*. 2002;4:209-14.

Pattison DI, Davies MJ, Hawkins CL. Reactions and reactivity of myeloperoxidase-derived oxidants: differential biological effects of hypochlorous and hypothiocyanous acids. *Free Radical Research*. 2012;46(8):975-95.

Paul BD, Snyder SH. H<sub>2</sub>S signalling through protein sulfhydration and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2012;13:499-507.

Posadas I, Bucci M, Roviezzo F, Rossi A, Parente L, Sautebin L, Cirino G. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. *British Journal of Pharmacology*. 2004;142:331-8.

Prajapati VD, Maheriya PM, Jani GK, Solanki HK. Carrageenan: a natural seaweed polysaccharide and its applications. *Carbohydrate Polymers*. 2014;105:97-112.

Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G. *Rang & Dale: Farmacologia* 7th ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

Rayner BS, Love DT, Hawkins CL . Comparative reactivity of myeloperoxidase-derived oxidants with mammalian cells. *Free Radical Biology and Medicine*. 2014;71:240-55.

Ren K. An improved method for assessing mechanical allodynia in the rat. *Physiology and Behavior*. 1999;67(5):711-6.

Roveroni RC, Parada CA, Cecília M, Veiga FA, Tambeli CH. Development of a behavioral model of TMJ pain in rats: the TMJ formalin test. *Pain*. 2001;94(2):185-191.

Sachs D, Cunha FQ, Ferreira SH. Peripheral analgesic blockade of hypernociception: activation of arginineNOcGMPprotein kinase GATP-sensitive K channel pathway. *PNAS USA*. 2004;101(10):3680-5.

Satoh K, Ogura N, Akutsu M, Kuboyama N, Kuyama K, Yamamoto H, Kondoh T. Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in IL-1 $\beta$ -induced synovitis of the temporomandibular joint. *Journal of Oral Pathology & Medicine*. 2009;38:584-59.

Schemann M, Grundy D. Role of hydrogen sulfide in the visceral nociception. *Gut*. 2009;58,744-7.

Schütz TCB, Anderson ML, Tufik S. Effects of COX-2 inhibitor in temporomandibular joint acute inflammation. *Journal of Dental Research*. 2007;86:475-9.

Seki H, Fukuda M, Lino M, Takahashi T, Yoshioka N. Immunohistochemical localization of cyclooxygenase-1 and -2 in synovial tissues from patients with internal

derangement or osteoarthritis of the temporomandibular joint. International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery. 2004;33:687-92.

Sen N, Paul BD, Gadalla MM, Mustafa AK, Sen T, Xu R, Kim S, Snyder SH. Hydrogen sulfide-linked sulfhydration of NF- $\kappa$ B mediates its antiapoptotic actions. Molecular Cell. 2012;45:13-24.

Seven A, Güzel S, Aslan M, Hamuryudan V. Lipid, protein, DNA oxidation and antioxidant status in rheumatoid arthritis. Clinical Biochemistry. 2008;41(7-8):538-43.

Sidhpuriwala J, Li L, Sparatore A, Bhatia M, Moore PK. Effect of S-diclofenac, a novel hydrogen sulfide releasing derivative, on carrageenan-induced hindpaw oedema formation in the rat. European Journal of Pharmacology. 2007;569:149-54.

Sieghart D, Liszt M, Wanivenhaus A, Bröll H, Kiener H, Klösch B, Steiner G. Hydrogen sulphide decreases IL-1b-induced activation of fibroblast-like synoviocytes from patients with osteoarthritis. Journal of Cellular and Molecular Medicine. 2015;19(1):187-97.

Siqueira JTT. Disfunção temporomandibular: classificação e abordagem. In: Siqueira JTT, Teixeira MJ. Dor orofacial, diagnóstico, terapêutica e qualidade de vida. Curitiba: Editora Maio, 2001: 373-401.

Smith WL, Garavito RM, DeWitt DL. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. Journal of Chemical Biology. 1996;271(52):33157-60.

Soares AC, Duarte ID. Dibutyryl-cyclic GMP induces peripheral antinociception via activation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in the rat PGE2-induced hyperalgesic paw. British Journal of Pharmacology. 2001;134:127-31.

Soares A C, Leite R, Tatsuo M A K F, Duarte I D G. Activation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels: mechanism of peripheral antinociceptive action of the nitric oxide donor, sodium nitroprusside. European Journal of Pharmacology. 2000;400:67-71.

Stankovic S, Vlajkovic S, Boskovic M, Radenkovic G, Antic V, Jevremovic D. Morphological and biomechanical features of the temporomandibular joint disc: An overview of recent findings. Archives of Oral Biology. 2013;58:1475-82.

Staurengo-Ferrari L, Zarpelon AC, Longhi-Balbinot DT, Marchesi M, Cunha TM, Alves-Filho JC, Cunha FQ, Ferreira SH, Casagrande R, Miranda KM, Verri WA Jr. Nitroxyl inhibits overt pain-like behavior in mice: role of cGMP/PKG/ATP-sensitive potassium channel signaling pathway. Pharmacological Reports. 2014;66(4):691-8.

Stein A, Bailey SM. Redox Biology of Hydrogen Sulfide: Implications for Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology. Redox Biology. 2013;1(1):32-9.

Steiner G, Tohidast-Akrad M, Witzmann G, Vesely M, Studnicka- Benke A, Gal A, Kunaver M, Zenz P, Smolen JS. Cytokine production by synovial T cells in rheumatoid arthritis. Rheumatology. 1999;38(3):202-13.

Stipanuk MH, Beck PW. Characterization of enzymic capacity for cysteine desulphhydration in liver and kidney of the rat. *Biochemical Journal*. 1982;206:267-77.

Streng T, Axelsson HE, Hedlund P, Andersson DA, Jordt SE, Bevan S, Andersson K E, Hogestatt ED, Zygmunt PM. Distribution and function of the hydrogen sulfide-sensitive TRPA1 ion channel in rat urinary bladder. *European Urology*. 2008;53:391-9.

Sun YG, Cao YX, Wang WW, Ma SF, Yao T, Zhu YC. Hydrogen sulphide is an inhibitor of L-type calcium channels and mechanical contraction in rat cardiomyocytes. *Cardiovascular Research*. 2008;79:632-41.

Takeuchi Y, Zeredo JL, Fujiyama R, Amagasa T, Toda K. Effects of experimentally induced inflammation on temporomandibular joint nociceptors in rats. *Neuroscience Letters*. 2004;354:172-4.

Tanaka E, Detamore MS, Mercuri LG. Degenerative disorders of the temporomandibular joint: etiology, diagnosis, and treatment. *Journal of Dental Research*. 2008;87:296.

Tang ML, Haas DA, Hu JW. Capsaicin-induced joint inflammation is not blocked by local anesthesia. *Anesthesia Progress*. 2004;51(1):2-9.

Tanimoto K, Iwabuchi Y, Tanne Y, Kamiya T, Inubushi T, Kunimatsu R, Mitsuyoshi T, Tanne K. Interleukin-1 beta affects cyclooxygenase-2 expression and cartilage metabolism in mandibular condyle. *Archives of Oral Biology*. 2011;56(11):1412-8.

Telezhkin V, Brazier SP, Cayzac S, Müller CT, Riccardi D, Kemp PJ. Hydrogen sulfide inhibits human BK<sub>Ca</sub> channels. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2009;648:65-72.

Tominaga K, Alstergren P, Kurita H, Kopp S. Clinical course of an antigen-induced arthritis model in the rabbit temporomandibular joint. *Journal of Oral Pathology and Medicine*. 1999;28(6):268-73.

Tominaga K, Habu M, Sukedai M, Hirota Y, Takahashi T, Fukuda J. IL-1 $\beta$ , IL-1 receptor antagonist and soluble type II IL-1 receptor in synovial fluid of patients with temporomandibular disorders. *Archives of Oral Biology*. 2004;49:493-9.

Trevisani M, Patacchini R, Nicoletti P, Gatti R, Gazzieri D, Lissi N, Zagli G, Creminon C, Geppetti P, Harrison S. Hydrogen sulfide causes vanilloid receptor 1-mediated neurogenic inflammation in the airways. *British Journal of Pharmacology*. 2005;145:1123-31.

Turnbull CM, Marcarino P, Sheldrake TA, Lazzarato L, Cena C, Fruttero R. A novel hybrid aspirin-NO-releasing compound inhibits TNF-alpha release from LPS-activated human monocytes and macrophages. *Journal of Inflammation (London)*. 2008;5(12).

Ukeda H, Maeda S, Ishii T, Sawamura M. Spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on tetrazolium salt 3'-{1-[(Phenylamino)-carbonyl]- 3,4-tetrazolium}-bis(4-methoxy-6-nitro) benzenesulfonic acid hydrate reduction by xanthine–xanthine oxidase. *Analytical Biochemistry*. 1997;251:206-9.

Vandooren J, Geurts N, Martens E, Van den Steen PE, Opdenakker G. Zymography methods for visualizing hydrolytic enzymes. *Nature Methods*. 2013;10(3):211-20.

Wallace JL, Blackler RW, Chan MV, Da Silva GJ, Elsheikh W, Flannigan KL, Gamaniek I, Manko A, Wang L, Motta JP, Buret AG. Anti-Inflammatory and cytoprotective actions of hydrogen sulfide: translation to therapeutics. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2015;22(5):398-410.

Wallace JL, Caliendo G, Santagada V, Cirino G, Fiorucci S. Gastrointestinal safety and anti-inflammatory effects of a hydrogen sulfide–releasing diclofenac derivative in the rat. *Gastroenterology*. 2007;132:261-71.

Wallace JL, Ferraz JGP, Muscará MN. Hydrogen sulfide: an endogenous mediator of resolution of inflammation and injury. *Antioxidants & Redox signaling*. 2012;17(1).

Wang R. Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed. *Physiological Reviews*. 2012;92(2):791-896.

Wang R. Two's company, three's a crowd: Can H<sub>2</sub>S be the third endogenous gaseous transmitter? *The FASEB Journal*. 2002;16:1792-8.

Wang XD, Kou XX, Mao JJ, Gan YH, Zhou YH. Sustained inflammation induces degeneration of the temporomandibular joint. *Journal of Dental Research*. 2012;91(5):499-505.

Wedmann R, Bertlein S, Macinkovic I, Böltz S, Miljkovic JL j, Muñoz LE, Herrmann M, Filipovic M R. Working with “H<sub>2</sub>S”: facts and apparent artifacts. *Nitric Oxide*. 2014;41:85-96.

Whiteman M, Armstrong JS, Chu SH, Jia-Ling S, Wong BS, Cheung NS, Halliwell B, Moore PK. The novel neuromodulator hydrogen sulfide: an endogenous peroxynitrite ‘scavenger’? *Journal of Neurochemistry*. 2004;90:765-8.

Whiteman M, Cheung NS, Zhu YZ, Chu SH, Siau JL, Wong BS, Armstrong JS, Moore PK. Hydrogen sulphide: a novel inhibitor of hypochlorous acid-mediated oxidative damage in the brain? *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2005;326:794-8.

Whiteman M, Li L, Rose P, Tan CH, Parkinson DB, Moore PK. The effect of hydrogen sulfide donors on lipopolysaccharide-induced formation of inflammatory mediators in macrophages. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2010;12(10):1147-54.

Whiteman M, Winyard PG. Hydrogen sulfide and inflammation: the good, the bad, the ugly and the promising. *Expert Review of Clinical Pharmacology*. 2011;4(1):13-32.

Wu Z, Peng H, Du Q, Lin W, Liu Y. GYY4137, a hydrogen sulfide- releasing molecule, inhibits the inflammatory response by suppressing the activation of nuclear factor- kappa B and mitogen- activated protein kinases in Coxsackie virus B3- infected rat cardiomyocytes. *Molecular Medicine Reports.* 2015;11(3):1837-44.

Yu XM, Sessle BJ, Vernon H, Hu JW. Effects of inflammatory irritant application to the rat temporomandibular joint on jaw and neck muscle activity. *Pain.* 1995;60(2):143-9.

Zanardo RC, Brancaleone V, Distrutti E, Fiorucci S, Cirino G, Wallace JL. Hydrogen sulfide is an endogenous modulator of leukocyte-mediated inflammation. *The FASEB Journal.* 2006;20(12):2118-20.

Zhang H, Zhi L, Moore PK, Bhatia M. Role of hydrogen sulfide in cecal ligation and puncture-induced sepsis in the mouse. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology.* 2006;290:L1193-201.

Zhang J, Sio SW, Moochhala S, Bhatia M. Role of hydrogen sulfide in severe burn injury-induced inflammation in mice. *Molecular Medicine.* 2010;16(9-10):417-24.

Zhou M, Qin S, Chu Y, Wang F, Chen L, Lu Y. Immunolocalization of MMP-2 and MMP-9 in human rheumatoid synovium. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology.* 2014;7(6):3048-56.